

Messung des Anisotropieabklingverhaltens einer Porphyrinprobe in Mizellen mit Hilfe eines selbstgebauten Frequenz-Domäne Fluorimeters

Dissertation
zur Erlangung des Grads
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

von
Josef Duschl
Regensburg 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 5. März 2003

Tag des Kolloquiums: 26. März 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. W. Kunz

Prüfungsausschuss:
Prof. Dr. H. Krienke
Prof. Dr. W. Kunz
Prof. Dr. G. Schmeer
Prof. Dr. B. König

meinen Eltern

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Mai 1999 bis Februar 2003 am Lehrstuhl für Chemie VI - Physikalische Chemie - der naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. Kunz, der mir ein Dissertationsthema anbot, das ich mit Begeisterung als Herausforderung annahm. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, die zahlreichen Gespräche in den Seminaren sowie seine großzügige finanzielle Förderung haben mir bei der Realisierung des anspruchsvollen Projekts sehr geholfen.

Ein großes Dankeschön ergeht auch an die Herren Fuchs, Birner und Dorfner. Alle drei Mitarbeiter der Werkstätten hatten maßgeblichen Anteil am erfolgreichen Bau des Fluorimeters. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Herrn Fuchs, der die umfangreichen Programmierarbeiten der Fluorimetersteuerung, der Meßwertaufnahme und der Auswertung übernommen hat. Ohne seine Fachkompetenz wäre das Gesamtprojekt so nicht realisierbar gewesen.

Ich danke auch Prof. Fidler und Herrn Martin Michl von der Arbeitsgruppe für molekulare Spektroskopie und Elektronik, Universität Prag, die mich in die Geheimnisse der Time-Domain Fluoreszenzspektroskopie eingeführt haben. Bei ihnen durfte ich noch kurzfristig Messungen durchführen, die mir zu genaueren Aussagen über den in der Arbeit benutzten Fluorophor verholfen haben.

Allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und für zahlreiche, nicht nur wissenschaftliche Gespräche. Dieser Dank gilt im besonderen den Kollegen, die mit mir gemeinsam das Studentenpraktikum betreut haben und der Kaffeerunde.

Inhaltsverzeichnis

1 Grundlagen	3
1.1 Beschreibung, Eigenschaften und Einteilung der Tenside	3
1.2 Tensidaggregate - Bildung und Strukturen	5
1.3 Die Geometrie der Tensidassoziate	8
1.3.1 Größe und Form von Mizellen an zwei Beispielen	9
1.3.1.1 Mizellen des C ₁₂ TAB / 1-Hexanol - Systems	9
1.3.1.2 Mizellen des SDS / TDMAO - Systems	9
1.4 Fluorophore zur Strukturaufklärung von Mizellen	10
1.5 Theorie der Fluoreszenzspektroskopie	14
1.5.1 Die Bedeutung der Lebensdauer oder der Abklingdauer	14
1.5.2 Prinzip der Fluorimetrie in der Frequenzdomäne	15
1.5.3 Abklingzeitmessungen in der Frequenzdomäne	15
1.5.4 Ausdrücke für die Intensitätsabklingdauer	17
1.5.5 Fluoreszenzabklingdauerermessungen mit Ausrichtung der Polfilter unter dem Magic Angle	18
1.5.6 Analyse der Daten des Intensitätsabklingverhaltens	18
1.5.7 Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie	19
1.5.8 Definition der Fluoreszenzanisotropie	20
1.5.9 Theorie der Anisotropie	20
1.5.10 Das Anregungsanisotropiespektrum	22
1.5.11 Ausdrücke für die Anisotropieabklingdauer	23
1.5.12 Messung der Abklingdauer der Anisotropie	23
1.5.13 Analyse der Anisotropieabklingdaten	25
1.5.14 Modelle für ein bestimmtes Anisotropieabklingverhalten	26

1.5.15	Der Einfluß der Rotationsdiffusion auf die Fluoreszenzanisotropien von sphärischen Rotoren: Die Perrin-Gleichung	27
1.5.16	Rotationsdiffusion von nicht-sphärischen Molekülen	27
1.5.17	Das Anisotropieabklingverhalten von nichtsphärischen Molekülen . .	28
1.5.18	Besondere Anordnung des Fluorophors innerhalb eines Rotationsellipsoids	31
2	Apparativer Teil	33
2.1	Der Aufbau der Messapparatur	33
2.2	Das Frequency-Domain Fluorimeter	35
2.2.1	Sein Aufbau	35
2.2.2	Das Prinzip der Kreuzkorrelationsdetektion	36
2.2.3	Die beiden Frequenzsynthesizer	36
2.2.4	Die beiden Lichtdetektoren	37
2.2.5	Digitalisierung des Photomultipliersignals	37
2.2.6	Charakterisierung der digitalisierten Sinussignale	37
2.2.7	Die Gesamtmessung	37
2.2.8	Die Auswertung der Meßdaten	38
2.2.9	Justierung des Fluorimeters	38
2.2.9.1	Justierung der Polfilter	38
2.2.9.2	Bestimmung des G-Faktors	39
2.2.10	Messungen von Fluoreszenzanisotropien nach der L-Format oder Einkanalmethode	39
2.2.11	Messungen der Rotationskorrelationszeit des Porphyrinmoleküls in einer Mizelle	41
2.3	Das isoperibole Titrationskalorimeter	42
2.3.1	Überlegungen beim Aufbau des Titrationskalorimeters	42
2.3.2	Die Temperaturmessungen	42
2.3.3	Der kalorimetrische Teil der Messapparatur	43
2.3.4	Bestimmung des ausgestoßenen Volumens der Präzionsspritzen . . .	45
2.3.5	Elektrisches und Chemisches Kalibrieren des Titrationskalorimeters	45
2.3.5.1	Elektrische Kalibrierung	45
2.3.5.2	Chemische Kalibrierung	46

2.4	Bedienung des Steuerprogrammes Flu_kal1	46
2.4.1	Der Menüpunkt Frequenzsynthesizer	46
2.4.2	Der Menüpunkt Optik	46
2.4.3	Der Menüpunkt Messkarte	47
2.4.4	Der Menüpunkt Messung	47
2.4.5	Der Menüpunkt Stromquelle	47
2.4.6	Der Menüpunkt Spritzen	48
2.4.7	Der Menüpunkt Kalorimetrie	48
3	Experimentelles	49
3.1	Synthese einer Mizellprobe	49
3.1.1	Sulfonieren von 2-Methylpyridin mit rauchender Schwefelsäure . . .	49
3.1.2	Methylierung von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure	50
3.1.3	Synthese von N-Cyclohexylethanimin	51
3.1.4	Synthese von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal	52
3.1.5	Kondensation von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat	53
3.1.6	Reaktion von Zimtaldehyd mit Malonsäure in Gegenwart von Pyridin	55
3.1.7	Reaktion von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit Malonsäurediethylester in Gegenwart von Piperidin und Benzoesäure	56
3.1.8	Bromierung von Dipropylenglykolmonomethylether durch Phosphortribromid	58
3.1.9	Reaktion von Dowanolbromid mit 4-Hydroxybenzaldehyd	59
3.1.10	Umsetzung von Dowanolbenzaldehyd mit Pyrrol	60
3.2	Fluoreszenzmessungen mit der Porphyrinsonde	63
3.2.1	Herstellung von Tensidlösungen, die das Porphyrinmolekül enthalten	63
3.2.1.1	Verwendete Chemikalien	63
3.2.1.2	Vorgehensweise zur Solubilisierung des Fluorophors in Tensidlösungen	63
3.2.2	Aufzeichnung eines Absorptions- und Emissionsspektrums des Porphyrinfluorophors in mizellarer Lösung	64
3.2.3	Aufzeichnung eines Anregungsanisotropiespektrums des Porphyrinfluorophors in Propylenglykol	64
3.2.4	Bestimmung von Fluoreszenzabklingdauer und Rotationskorrelationszeit der Porphyrinsonde in mehreren binären und ternären Tensidsystemen	64

4	Darstellung der Messergebnisse	65
4.1	Spektroskopische Charakterisierung der Fluorophore	65
4.1.1	Absorptions- und Emissionsmessungen der Proben	65
4.1.1.1	Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektren von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in verschiedenen Lösungsmitteln	65
4.1.1.2	Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektren von 1- (1-Methyl- pyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta- 1,3-dien in verschiedenen Lösungsmitteln	68
4.1.1.3	Aufnahme eines Absorptions- und Emissionsspektrums des Porphyrinfarbstoffs in wäßriger SDS-Lösung	70
4.1.2	Messung der Fluoreszenzlebensdauer der synthetisierten Fluoropho- re in Tensidlösung	70
4.1.3	Bestimmung eines Anregungsanisotropiespektrums des Porphyrin- derivats	77
4.2	Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten	78
4.2.1	Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde im C ₁₂ TAB / 1-Hexanol - System	78
4.2.2	Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde in Na- triumoctylsulfat, -decylsulfat und -dodecylsulfat	79
4.2.3	Publizierte Daten über Radien von Natriumalkylsulfat- und Alkyl- trimethylammoniumbromidmizellen	80
4.2.4	Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde in Te- trahydrofuran	81
4.2.5	Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde im System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid	81
	Abbildungsverzeichnis	99
	Tabellenverzeichnis	102
	Literaturverzeichnis	103

Konstanten und verwendete Symbole

Wichtige Naturkonstanten

Gaskonstante	$R = 8.3145$	$JK^{-1}mol^{-1}$
Avogadro Konstante	$N_A = 6.02214 \cdot 10^{23}$	mol^{-1}

Verwendete Symbole

a_0	$[m^2]$	Flächenbedarf einer Kopfgruppe eines Tensidmoleküls
α_i		Anteil der Komponente i an der Gesamtintensitätsabklingdauer
β	$[^\circ]$	Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten von Absorption und Emission
$C_0(m)$	$[JK^{-1}]$	Wärmekapazität des gefüllten Kalorimeters
χ^2		Fitgüte
cpp		kritischer Packungsparameter
D	$[s^{-1}]$	Rotationsdiffusionskoeffizient
Δ_ϕ	$[^\circ]$	experimentelle Standardabweichung der Phase
Δ_m		experimentelle Standardabweichung der Modulation
Δ_ω	$[^\circ]$	Phasenverschiebung zwischen der senkrechten und der parallelen Komponente der Emission bei der Modulationsfrequenz ω
$\Delta_{c\omega}$	$[^\circ]$	errechnete Phasenverschiebung zwischen der senkrechten und der parallelen Komponente der Emission bei der Modulationsfrequenz ω
$E_{elektr.}$	$[J]$	elektrische Energie
ϵ		relative Dielektrizitätszahl
F	$[Hz]$	Lichtmodulationsfrequenz
$\phi_{c\omega}$	$[^\circ]$	errechneter frequenzabhängiger Phasenwinkel
ϕ_ω	$[^\circ]$	Phasenwinkel bei der Anregungsfrequenz ω
$\phi_{ }$	$[^\circ]$	Phasenwinkel der parallelen Komponente
ϕ_\perp	$[^\circ]$	Phasenwinkel der senkrechten Komponente
g_i		Anteil der Amplituden der einzelnen Komponenten i an der Gesamtanisotropie
Γ_i	$[s^{-1}]$	Intensitätsabklingrate der Komponente i
η	$[Pas]$	Viskosität
i		Zahl der Abklingzeiten
I		Emissionsintensität
I	$[A]$	Stromstärke
$I_{ }$		Intensität der parallelen Komponente der Emission
I_\perp		Intensität der senkrechten Komponente der Emission
I_0		Anfangsemissionsintensität
I_{ges}		Gesamtintensität

k_{nonrad}	$[s^{-1}]$	Geschwindigkeitskonstante der strahlungslosen Relaxation
k_{rad}	$[s^{-1}]$	Emissionsgeschwindigkeitskonstante
κ		Abkühlungskonstante
l_c	$[m]$	kritische Länge des hydrophoben Restes eines Tensidmoleküls
Λ_ω		Amplitudenverhältnis der parallelen und der senkrechten Komponente bei der Modulationsfrequenz ω
$\Lambda_{c\omega}$		errechnetes Amplitudenverhältnis der parallelen und der senkrechten Komponente bei der Modulationsfrequenz ω
$m_{c\omega}$		errechnete frequenzabhängige Modulation
m_ω		Modulation bei der Anregungsfrequenz ω
M	$[g/mol]$	Molmasse
n		Brechungsindex
n_0		Zahl der Fluorophore im angeregten Zustand
θ	$[K]$	Temperatur
θ_j	$[s]$	Rotationskorrelationszeit der Komponente j
r		Anisotropie
r_0		Fundamentalanisotropie
r_ω		frequenzabhängige Anisotropie
R	$[\Omega]$	elektrischer Widerstand
R_j	$[s^{-1}]$	Rotationsdiffusionskonstante der Komponente j
ρ		Verhältnis der Achsenlängen
S_0		elektronischer Singulettgrundzustand
S_1		erster elektronisch angeregter Singulettzustand
S_H		Durchlässigkeit des Emissionskanals für horizontal polarisiertes Licht
S_V		Durchlässigkeit des Emissionskanals für vertikal polarisiertes Licht
t	$[s]$	Zeit
T	$[K]$	absolute Temperatur
τ_i	$[s]$	Fluoreszenzabklingzeit der Komponente i
v		Anzahl der Freiheitsgrade (Anzahl der Messungen minus Anzahl der variablen Parameter)
$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F$	$[cm^{-1}]$	Stokes Shift
V	$[m^3]$	Volumen einer Mizelle oder des hydrophoben Anteils eines Tensidmoleküls
ω	$[s^{-1}]$	Kreismodulationsfrequenz

Verwendete Abkürzungen

CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
C ₁₂ TAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
C ₁₄ DMAO	Tetradecyldimethylaminoxid
DANS	2-(N-Decylamino)-naphthalin-6-sulfonat
DIFANL	Global frequency domain anisotropy differential phase and modulation analysis
DTA	Differentialthermoanalyse

FD	Frequenzdomäne
HANS	2-(N-Hexadecylamino)-naphthalin-6-sulfonat
NaDS	Natriumdecylsulfat
NaOS	Natriumoctylsulfat
NMR	nuclear magnetic resonance
o/w	Öl in Wasser
ppm	parts per million
RF	Radiofrequenz
SANS	small angle neutron scattering
SDS	Natriumdodecylsulfat
TDMAO	Tetradecyldimethylaminoxid
w/o	Wasser in Öl

Einleitung

Die Bestimmung der Mizellgröße und ihrer Gestalt wird hauptsächlich durch Streuver-
suche, wie Licht- oder Neutronenstreuung, vorgenommen. Fluorimetrische Methoden, die
mittels zeitaufgelöster Anisotropiemessungen Aussagen über Größe und Gestalt von Mi-
zellen erlauben, bildeten bislang die Ausnahme. Die verwendeten Fluorophore erlauben
aufgrund ihrer deutlich kleineren Größe verglichen mit der Größe einer Mizelle nur ei-
ne Aussage über ihre Eigenbewegung und bevorzugte Anordnung innerhalb einer Mizelle
[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Globale Rotationsbewegungen von Mizellen werden in der Literatur
nur unzureichend beschrieben. Die Untersuchung der Rotationsbewegung von Proteinen,
die kovalent mit Fluorophorproben markiert wurden, ist dagegen bekannt [9].

Diese Arbeit befaßt sich mit dem Aufbau eines Meßgeräts, das zugleich Titrationskalori-
meter und Fluorimeter ist. Mit diesem Meßgerät läßt sich zeitaufgelöst das Anisotropieab-
klingverhalten einer Fluorophorprobe messen. Solche Fluorimeter, die in der Frequenzdo-
mäne arbeiten, sind in der Literatur beschrieben [10, 11, 12, 13, 14]. Der besondere Vor-
teil dieses Gerätes besteht darin, durch kontrollierte Zugabe von wäßriger Tensidlösung,
Cotensid und einer weiteren flüssigen Komponente kontinuierlich die Zusammensetzung
verändern und gleichzeitig fluorimetrische und kalorimetrische Messungen durchführen zu
können. Mit Hilfe dieser Apparatur und eines neu entwickelten Fluoreszenzfarbstoffes soll
der Versuch unternommen werden, Mizelldurchmesser und Mizellgestalt zu bestimmen.
Der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Fluoreszenzfarbstoff, ein lichtstabiles Tetra-
phenylporphyrinderivat, dient dabei als Meßsonde. Er läßt sich durch einen 655 nm Di-
odenlaser anregen und besitzt vier Dipropylenglykolmonomethyletherketten, die ihn zum
einen in der Mizelle verankern und zum anderen wasserunlöslich machen. Die Anregung bei
dieser Wellenlänge bewirkt eine maximale Fundamentalanisotropie seines Emissionslichtes
[15, 16]. Die Abklingdauer von ca. 10 ns liegt im Bereich der Zeitdauer einer globalen Ro-
tation einer Mizelle. Der Durchmesser des planaren Farbstoffes liegt bei ca. 35 Angström
und damit im Bereich des Durchmessers einer durchschnittlichen Mizelle.

Im folgenden sollen zunächst die Grundlagen für die fluorimetrischen Untersuchungen ge-
legt werden. Danach werden die experimentellen Ergebnisse und ihre Auswertung darge-
stellt, diskutiert und eine kurze Zusammenfassung gegeben.

Kapitel 1

Grundlagen

1.1 Beschreibung, Eigenschaften und Einteilung der Tenside

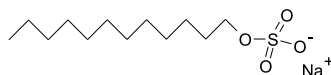
Tenside sind meist niedermolekulare Verbindungen, die sich durch ihr amphiphiles Verhalten auszeichnen. Ein Tensidmolekül besteht dabei im allgemeinen aus einem polaren Kopfteil und einem unpolaren Molekülrest, die kovalent aneinander gebunden sind. Als Kopfgruppe bezeichnet man den hydrophilen Teil, der von geladenen oder neutralen polaren Gruppen gebildet wird. Der unpolare Molekülteil besteht meist aus einer unverzweigten Alkyl- bzw. Arylalkylkette mit ca. 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette. Es gibt auch Tenside mit mehreren Kopfgruppen und bzw. oder hydrophoben Ketten. Das amphiphile Verhalten der Tenside wird wesentlich durch die Art, die Anzahl und die Größenverhältnisse hydrophiler und hydrophober Gruppen hervorgerufen [17].

Tenside sind oberflächen- und grenzflächenaktiv: sie reichern sich an Phasengrenzen unterschiedlicher Polarität an und orientieren sich mit ihrem Kopfteil zur polaren Phase und mit ihrem hydrophoben Molekülrest zur unpolaren Phase hin an. Dabei verringern sie die Oberflächen- oder Grenzflächenspannung zwischen diesen beiden Phasen. Generell zeichnen sich Tenside dadurch aus, daß sie die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzen. Ihre Löslichkeit in Wasser hängt dabei von der Länge des hydrophoben Molekülteils, der Art der Kopfgruppe, der Wertigkeit des Gegenions und der Lösungsumgebung ab. Für ionische Tenside gilt, daß sich ihre Löslichkeit in Wasser mit steigender Temperatur erhöht. Man beobachtet dabei einen plötzlich einsetzenden starken Löslichkeitsanstieg bei der sogenannten Kraffttemperatur. Nichtionische Tenside zeigen wegen ihrer andersartigen Solubilisierung keine Kraffttemperatur. Mit steigender Temperatur erniedrigt sich ihre Löslichkeit in Wasser soweit, daß eine Phasentrennung auftritt, die sich als eine trübe Suspension des Tensids in Wasser zeigt. Die Temperatur, bei der Phasentrennung auftritt, nennt man Trübungspunkt dieses Tensids.

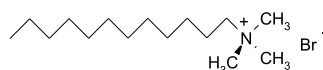
Tenside lassen sich nach der Struktur ihrer polaren Kopfgruppe in unterschiedliche Klassen einteilen (siehe Abbildung 1.1):

- anionische Tenside:
 - Carboxylate ($R - \text{COO}^-$)
 - Sulfonate ($R - \text{SO}_3^-$)
 - Sulfate ($R - \text{OSO}_3^-$): z.B. $\text{NaC}_{12}\text{OSO}_3$ (SDS)
- kationische Tenside:
 - quartäre Ammoniumsalze ($R - \text{N}^+ \text{R}_3$): z.B. C_{12}TAB
- zwitterionische (amphotere) Tenside:
 - Betaine ($\text{R}_3 - \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_n - \text{COO}^-$)
 - Sulfobetaine ($\text{R}_3 - \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_n - \text{SO}_3^-$)
 - Aminoxyde ($\text{R} - \text{N}^+ - \text{O}^-$)
- nichtionische Tenside:
 - Polyethertenside, wie Polyethylenoxidentenside ($\text{RO} - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_n - \text{H}$)
 - Zuckertenside

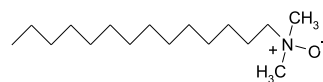
anionisches Tensid
 $\text{NaC}_{12}\text{OSO}_3$, SDS



kationisches Tensid
 C_{12}TAB



zwitterionisches Tensid
 $\text{C}_{14}(\text{CH}_3)_2\text{NO}$, TDMAO



nichtionisches Tensid
 $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$

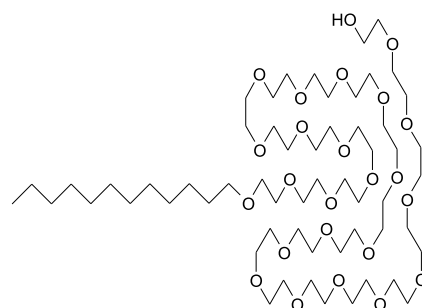


Abbildung 1.1: Beispiele für ionische und nichtionische Tenside

1.2 Tensidaggregate - Bildung und Strukturen

Oberhalb der Kraffttemperatur kommt es in sehr verdünnten wässrigen Lösungen kaum zu polaren und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen ionischen Tensidmolekülen. In diesem Konzentrationsbereich liegt eine molekulare Lösung vor, in der je nach Tensidtyp bereits eine prä Mizellare Aggregation der Tensidmoleküle stattfinden kann. Bei höherer Konzentration als die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) assoziieren Tensidmoleküle in Lösungen zu hochmolekularen geordneten Strukturen. Es können sich so normale oder inverse Mizellen, Vesikel oder Mikroemulsionen ausbilden, siehe Abbildung 1.2. Diese Strukturen wurden mit einer Vielzahl von Meßtechniken untersucht wie kernmagnetische Resonanz (NMR), Elektronenspinresonanz (ESR), Kleinwinkelneutronenstreuung (SANS), Lichtstreuung, Fluoreszenzspektroskopie und Kalorimetrie. Als Ergebnis läßt sich generell sagen, daß die meisten Tensidmoleküle in wässriger Lösung so zu Aggregaten von 30 - 200 Monomeren assoziieren, daß ihre hydrophoben Molekülteile sich zusammenlagern und dadurch gegenseitig geschützt sind vor extensiven Kontakt mit der Wasserphase, die diese Strukturen umgibt. Diese Aggregate sind keine statischen Spezies. Es gibt einen konstanten schnellen Austausch zwischen den Aggregaten und der sie umgebenden Lösungsphase.

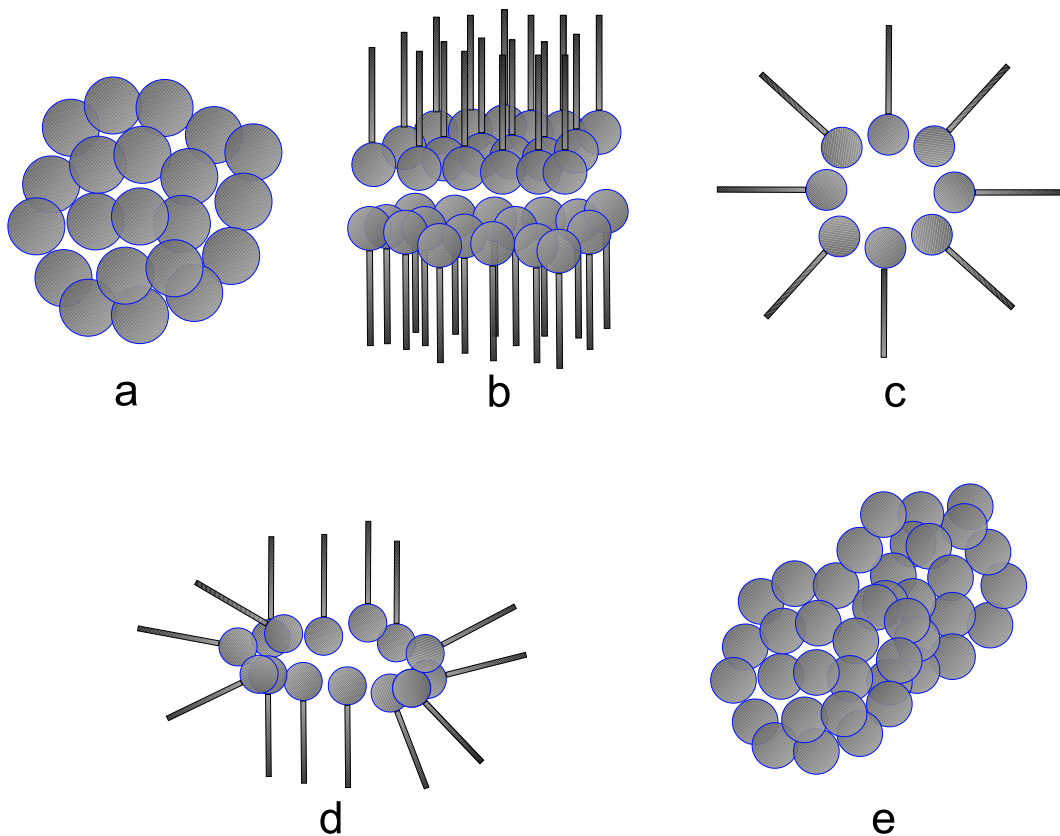


Abbildung 1.2: Beispiele von möglichen Mizellgestalten: a: sphärisch, b: lamellar, c: invertiert, d: scheibenförmig und e: zylindrisch oder stäbchenförmig

Bei ionischen Mizellen enthält die Grenzflächenregion zwischen Mizelle und Lösung die ionischen Kopfgruppen, die Gegenionen, die an die Mizelle gebunden sind, sowie Wasser. Diese elektrische Doppelschicht wird als Stern-Schicht bezeichnet. Die verbleibenden Gegenionen befinden sich im Gouy-Chapman Bereich der elektrischen Doppelschicht, die sich weiter in die wäßrige Phase erstreckt. Für nichtionische Tenside mit Polyoxyethylengruppen ist die Struktur grundlegend gleich, außer daß die äußere Region keine Gegenionen, sondern Knäuel hydratisierter Polyoxyethylengruppen enthält. Die innere Region der Mizelle enthält die hydrophoben Ketten. Ihr Radius entspricht in etwa der Länge einer ausgedehnten hydrophoben Kette. Die ersten paar Methylengruppen nach der Kopfgruppe werden oft noch der Hydratationssphäre der Mizelle zugerechnet. Abbildung 1.3 gibt schematisch den Bau einer Mizelle eines ionischen Tensids wieder.

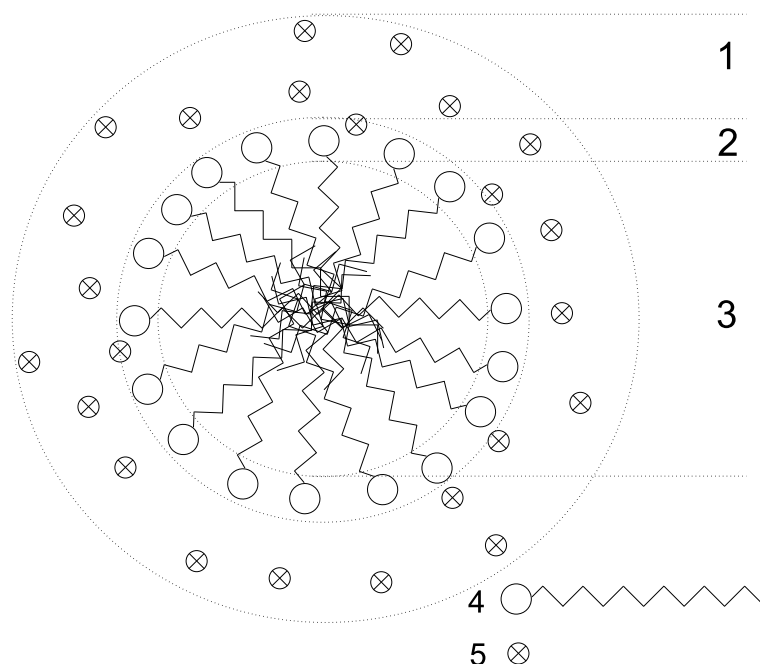


Abbildung 1.3: Mizelle eines ionischen Tensids: 1 = Gouy-Chapman-Bereich, 2 = Stern-Schicht, 3 = hydrophober Kern, 4 = Tensid, 5 = Gegenion

Die Bildung solcher Strukturen ruft teilweise dramatische, diskontinuierliche Änderungen in den makroskopischen Eigenschaften hervor, die diese Tensidlösungen innerhalb eines kleinen Konzentrationsbereichs zeigen, siehe Abbildung 1.4. Falls man Äquivalentleitfähigkeiten mißt, läßt sich die Unstetigkeit in der Abnahme dadurch erklären, daß die Masse pro Einheitsladung der leitenden Spezies zunimmt. Im Fall von Lichtstreuung nimmt die Streuintensität abrupt zu, was durch Auftreten einer streuenden Spezies erklärt werden kann, die viel größer ist als ein gelöstes Tensidmonomer.

Wenn ein Molekül, das sowohl hydrophobe als auch hydrophile Gruppen enthält, in Wasser eingeführt wird, so wird die Struktur des Wassers in der Umgebung dieses Moleküls gestört. Mizellbildung ist neben der Adsorption an den Grenzflächen der Lösung ein möglicher Mechanismus, um diese Störung der Struktur des umgebenden Wassers zu minimieren. Obwohl die Wegnahme des hydrophoben Molekülteils von der Wassenumgebung eine

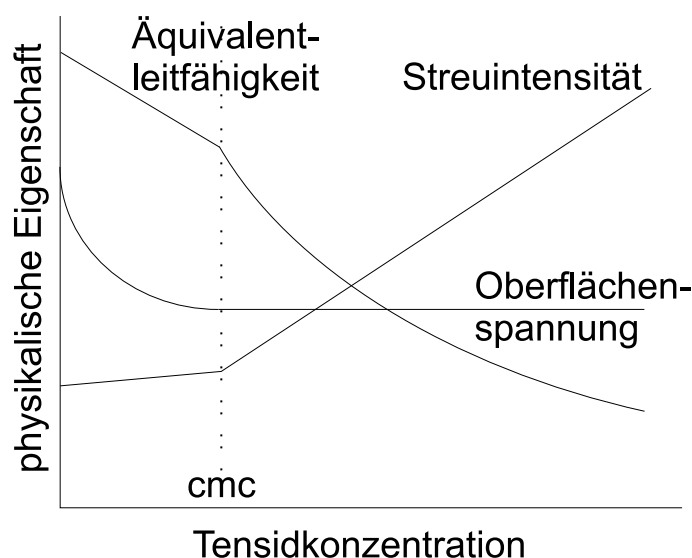


Abbildung 1.4: drei wichtige Manifestationen der Mizellbildung: abrupte Änderungen in der Leitfähigkeit der Lösung, eine Diskontinuität der Oberflächenspannungskurve und eine plötzliche Zunahme in der Streuintensität der Lösung

Verkleinerung der freien Energie bedeutet, erfährt dieses adsorbierte oder aggregierte Molekülteil dadurch einen Entropieverlust. Das hydrophile Molekülteil erniedrigt in Wasser die freie Energie des Systems. Wird diese Gruppe durch Adsorption oder Mizellbildung aus der Wasserphase weggenommen, steigt die freie Energie des Systems. Zusätzlich kann die Kopfgruppe eine elektrostatische Ladung tragen, so daß Mizellbildung oder Adsorption eine elektrostatische Abstoßung dieser Gruppen mit sich bringt. Das Auftreten von Mizellbildung in einem Tensidsystem und die Konzentration, bei der erstmalig dieses Phänomen auftritt, wird von den Kräften bestimmt, die diesen molekularen Aggregationsprozeß fördern oder hemmen.

Die treibende Kraft der Mizellbildung besteht in der Minimierung der Wasserkontakte mit den hydrophoben Molekülteilen. Mit weiter steigender Tensidkonzentration erhöht sich die Anzahl der Mizellen, deren Ausmaße und Gestalt sich verändern können. Es können so scheiben- oder zigarrenförmige Ellipsoide auftreten. In nichtwässrigen Lösungsmitteln entstehen mit wachsender Tensidkonzentration inverse Mizellen mit einer umgekehrten Anordnung der Tensidmoleküle. So sind in einer inversen Mizelle nicht die polaren Kopfgruppen, sondern die hydrophoben Tensidbereiche zur Lösungsmittelphase gerichtet.

Wird einem System Tensid-Lösungsmittel noch eine dritte Komponente, ein Cotensid, zugesetzt, so bilden sich weitere Phasen. Wird schließlich dem ternären System noch eine vierte Komponente, z.B. Dodekan, hinzugefügt, so bilden sich in bestimmten Konzentrationsbereichen sehr stabile Öl in Wasser (o/w) bzw. Wasser in Öl (w/o) Emulsionen, sogenannte Mikroemulsionen. Mikroemulsionen sind thermodynamisch stabile isotrope Lösungen. Sie enthalten größere Mengen sowohl stark polarer als auch stark unpolarer Komponenten, die durch ein Tensid stabilisiert werden. Typisch für sie sind nahezu kugelförmige Tröpfchen, die eine kleine Streubreite des Kugelradius haben. Mikroemulsionen können aber auch bikontinuierliche Strukturen ausbilden. Dies sind Strukturen, bei denen ölsreiche und wasserreiche Kompartimente nur durch einen Tensidfilm getrennt ineinander verwoben sind.

1.3 Die Geometrie der Tensidassoziate

Die Packung der Tensidmoleküle zu einer bestimmten geometrischen Form wird nach Isrealachvili [18] und Mitchell [19] durch den sogenannten kritischen Packungsparameter (cpp) geregelt: $cpp = V/(a_0 \cdot l_c)$. Dabei bedeutet V das Volumen des hydrophoben Anteils des Moleküls, a_0 die Fläche der Kopfgruppe und l_c die kritische Länge des hydrophoben Restes. Die folgende Abbildung 1.1 zeigt die Abhängigkeit der Assoziatgeometrien vom kritischen Packungsparameter.

kritischer Packungsparameter	allgemeiner Tensidtypus	erwartete Aggregatstrukturen
< 0.33	einfache Tenside mit Einzelkette und relativ großer Kopfgruppe	sphärische oder ellipsoidale Mizellen
0.33 – 0.5	einfache Tenside mit relativ kleiner Kopfgruppe oder ionische Tenside in der Gegenwart von großen Elektrolytmengen	relativ große zylindrische oder stäbchenförmige Mizellen
0.5 – 1.0	doppelkettige Tenside mit großer Kopfgruppe und flexiblen Ketten	Vesikel und flexible Doppelschichtstrukturen
1.0	doppelkettige Tenside mit kleiner Kopfgruppe oder rigiden Ketten	planar ausgedehnte Doppelschichtstrukturen
> 1.0	doppelkettige Tenside mit kleiner Kopfgruppe und sehr großen hydrophoben Gruppen	inverse Mizellen

Tabelle 1.1: Erwartete Aggregatgeometrien als Funktion des kritischen Packungsparameters

Ausgehend von ionischen kugelförmigen Mizellen läßt sich die Gestalt durch Zugabe von Salz oder neutralen Cotensiden, wie mittel- oder langkettige Alkohole, verändern. Die Zugabe von Salz bewirkt, daß die gegenseitige Abstoßung der Kopfgruppen und damit deren benötigte Fläche a_0 kleiner wird, was zu einer Vergrößerung des kritischen Packungsparameters führt. In die gleiche Richtung zielt die Zugabe von Cotensiden, die das Volumen V des hydrophoben Molekülteils vergrößern. Ausgehend von kugelförmigen Mizellen, die $C_{12}TAB$ in Wasser bildet, ergeben sich durch Zugabe von 1-Hexanol zylindrische Mizellen. Gibt man zu einem Tensid, welches in Wasser kugelförmige Mizellen bildet wie das Natriumdodecylsulfat, ein zwitterionisches Tensid, das aufgrund seines kleinen hydratisierten Kopfbereiches lange stabförmige Mizellen bildet, so läßt sich der Übergang von kugelförmigen zu zylinderförmigen Mizellen studieren. Diese beiden Beispiele wurden ausgewählt, um als Modellsysteme für eine Untersuchung mit Hilfe einer neuen Meßtechnik zu dienen. Diese beruht auf der Messung des Fluoreszenzanisotropieabklingverhaltens einer in die Mizellen eingebrachten Fluorophorprobe.

1.3.1 Größe und Form von Mizellen an zwei Beispielen

1.3.1.1 Mizellen des C₁₂TAB / 1-Hexanol - Systems

Reine C₁₂TAB - Mizellen haben Kugelform. Oberhalb der CMC ändert sich mit steigender Tensidkonzentration der Mizellradius kaum. Gibt man nun 1-Hexanol zu, so bilden sich prolate Mizellen. Tabelle 1.2 gibt die Halbachsenlängen der gebildeten Mizellen als Funktion der Konzentration von C₁₂TAB und 1-Hexanol an. (nach bislang unpublizierten Auswertungen von Neutronenstreuungsmessungen durch Prof. Kunz)

$\frac{c(C_{12}TAB)}{mol/l}$	$\frac{c(1-Hexanol)}{mol/l}$	$\frac{r_1}{Angstrom}$	$\frac{r_2}{Angstrom}$
0.033	0	19	19
0.055	0	19.5	19.5
0.077	0	19.75	19.75
0.110	0	20	20
0.165	0	20	20
0.220	0	20	20
0.033	0.0163	17.5	24
0.055	0.0272	17.7	25
0.077	0.0379	17.5	28
0.110	0.0543	17.5	29
0.165	0.0815	17.5	33
0.220	0.1082	17.0	45

Tabelle 1.2: Länge der Halbachsen r_1 und r_2 in Angström für Mizellen aus verschiedenen Mischungen von wässrigen C₁₂TAB- und 1-Hexanollösungen

1.3.1.2 Mizellen des SDS / TDMAO - Systems

Mischungen von jeweils 60 millimolaren SDS und TDMAO - Lösungen in verschiedenen Verhältnissen von 0:10 bis 10:0 ergeben Mizellen mit folgenden Achsradien a, b und c nach [20]. Die Daten wurden mit Hilfe von Kleinwinkelneutronenstreuung gewonnen.

	TDMAO : SDS - Verhältnis									
	0:10	1:9	2:8	3:7	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1	10:0
a / nm	1.90	1.6	1.6	1.6	1.6	1.63	1.59	1.63	1.66	1.6
b / nm	1.90	2.08	2.08	2.18	3.18	3.37	3.29	2.52	2.44	1.6
c / nm	1.90	2.34	2.8	3.6	5.5	5.6	5.6	5.9	9.4	≥150

Tabelle 1.3: Halbachsenlängen a, b und c für Mizellen aus Mischungen von wässrigen SDS- und TDMAO-Lösungen in einer Gesamtkonzentration von 60 mmol/l

1.4 Fluorophore zur Strukturaufklärung von Mizellen

Fluorophore, die zur Strukturaufklärung von Mizellen geeignet sind, müssen mehrere Bedingungen erfüllen. Sie sollen eine Abklingdauer aufweisen, die im Bereich einer Rotation um eine Hauptachse einer Mizelle liegt. Diese Zeit dauert etwa 10 Nanosekunden. Ihre Fundamentalanisotropie bei der Anregungswellenlänge darf nicht zu nahe bei null liegen. Ferner ist es günstig, daß geeignete Fluorophore mit kostengünstig erhältlichen Lichtquellen angeregt werden können. Das Volumen des Fluorophors muß verglichen mit der der Mizelle klein sein, damit die Mizellen kaum verändert werden. Der Fluorophor darf sich nicht im Lösungsmittel, sondern ausschließlich innerhalb der Mizelle lösen und muß sich dort im Kernbereich fest verankern.

Fluorophore, die diese Eigenschaften prinzipiell erfüllen können, sind Pyrene, Aminonaphthalinsulfonate und Porphyrine.

Pyren selbst hat in entgasteten organischen Lösungsmitteln eine Abklingzeit von 400 ns und Pyrenderivate mit einem Alkylrest haben eine Abklingzeit von typischerweise 100 ns. Pyren selbst ist für Anisotropieexperimente eher ungeeignet, da es nur eine kleine Fundamentalanisotropie aufweist. 1-Pyren sulfonsäure zeigt eine Abklingdauer von 45 ns, verbunden mit einer Anisotropie, die es für Anisotropiemessungen geeignet erscheinen läßt [21]. Es liegt nahe, durch Vergrößerung des chromophoren Systems des Pyrens für eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zu sorgen, sowie möglicherweise eine größere Fundamentalanisotropie bei einer nur gering verkürzten Intensitätsabklingzeit zu erzielen. Dieser Weg wurde zunächst in dieser Dissertation eingeschlagen, es zeigte sich aber, daß die Abklingzeit eines solchen Derivates nicht länger als ca. 1 ns ist.

Aminonaphthalinsulfonate, wie das 2-(N-hexadecylamino)-naphthalin-6-sulfonat (HANS) haben Abklingzeiten von 10 bis 15 ns und sind für Anisotropiemessungen geeignet. Mit diesem Fluorophor wurden bereits Messungen an Mizellen durchgeführt. Allerdings bildet sich bei diesem Fluorophor ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der Kopfgruppenregion und dem Mizellinneren aus. Dadurch kommt es zu einem biexponentiellen Intensitätsabklingverhalten und zu multiexponentiellen Anisotropieabklingverhalten [3].

Porphyrine und Tetraphenylporphyrine haben Abklingzeiten bis 15 ns und Fundamentalanisotropien bis nahe an 0.4 heranreichend [16]. Sie lassen sich durch rote Diodenlaser anregen und sind mit langen Alkylresten derivatisiert in der Literatur beschrieben [22]. Diese Eigenschaften machen sie zu einer idealen Sonde, um die Größe und Gestalt von Mizellen aufzuklären. Alle beschriebenen Fluorophore sind in Abbildung 1.5 aufgeführt.

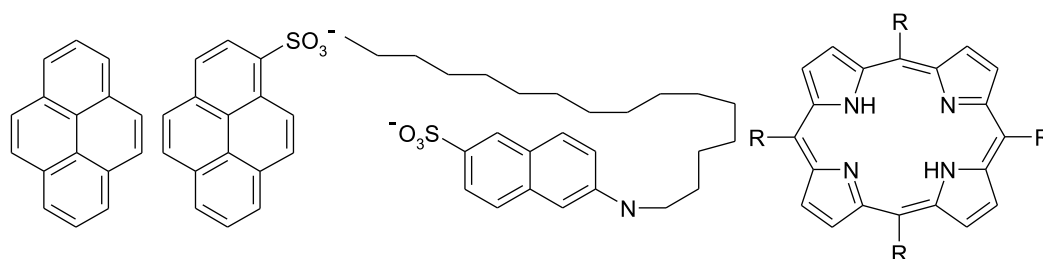


Abbildung 1.5: Fluorophore, die zur Strukturaufklärung von Mizellen geeignet sind. Von links nach rechts sind abgebildet: Pyren, 1-Pyren sulfonsäure, 2-(N-hexadecylamino)-naphthalin-6-sulfonat und ein Porphyrinderivat

In der Literatur finden sich Beispiele für Messungen der Rotationsdiffusion von Fluoreszenzfarbstoffen in Mizellen:

Chou et al. [23] berichten von Anisotropieabklingmessungen von Acridin Orange in SDS-Mizellen. Gemessen wurde überhalb der CMC ein biexponentielles Anisotropieabklingverhalten mit Rotationskorrelationszeiten von 1.68 und 0.28 ns. Die Rotationskorrelationszeiten von Acridin Orange entlang seinen Symmetrieachsen wurden unter Annahme einer Mizellrotationskorrelationszeit von 8 ns zu 0.33 ns und 2.1 ns modelliert.

Rhodamin B und Octadecylrhodamin B wurden als Anisotropieproben in inversen AOT-Mizellen, die Wasser und Glycerin in Heptan oder Dodekan enthalten, eingesetzt [5]. Im Fall von Glycerin in Heptan bei kleinen Wassergehalten der Lösung ergab sich eine gute Übereinstimmung von experimentellen und berechneten Rotationskorrelationszeiten der Mizelle. Da die Viskosität von Glycerin 1500-fach größer ist als die von Wasser, konnte so die Eigenrotation des Fluorophors eingedämmt werden und es wird die Gesamtbewegung der Mizelle sichtbar. Das Anisotropieabklingverhalten wurde mit zwei Rotationskorrelationszeiten gefittet, wobei die kürzere Korrelationszeit mit der Probe in der Grenzschicht zwischen Kopfgruppenregion und Kern und damit nicht von Glycerin umgeben in Verbindung gebracht wird. Die längere Rotationskorrelationszeit ist im Bereich der Gesamtrotation korreliert.

Eine weitere Publikation untersuchte das Intensitäts- und Anisotropieabklingverhalten von mehreren Porphyrinderivaten und deren Zinkkomplexen in wässrigen Lösungen von Triton X-100, Hexadecyltrimethylammoniumbromid und SDS [1]. Das Intensitätsabklingverhalten der Porphyrinproben ist in Triton X-100 und C₁₆TAB Mizellen monoexponentiell und in SDS Mizellen biexponentiell. Das Anisotropieabklingverhalten wird am besten durch eine biexponentielle Funktion wiedergegeben. Als Modell wird eine Fluoreszenzdepolarisation vorgeschlagen, die durch Rotations- und Translationsdiffusion des Porphyrins innerhalb der Mizelle und sowie durch die Gesamtrotation der Mizelle hervorgerufen wird.

Quitevis et al. [4] berichten von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen von Merocyanin 540 und Octadecylrhodamin in Alkoholen und in SDS-, C₁₂TAB- und Triton X-100- Mizellen. In Alkoholen war das Anisotropieabklingverhalten monoexponentiell. In Mizellen war das Anisotropieabklingverhalten biexponentiell mit einer kurzen und einer langen Rotationskorrelationszeit. Die Resultate in Mizellen werden durch ein Zwei-Schritt-Modell, das aus einer schnellen begrenzten Rotation der Probe und einer langsamen lateralen Diffusion der Probe in der Mizelle besteht, interpretiert.

Lianos et al. [24] benutzen die Abklingdauer von Pyren, um die Variation der Aggregationszahl in mizellaren Lösungen von SDS nach Zugabe von 1-Pentanol und Öl (Dodekan oder Toluol) zu messen. Sie untersuchten die Polarität der Mikroumgebung von Pyren durch Messung des Verhältnisses der ersten und dritten Fluoreszenzbande von Pyren, sowie durch die intramizellare Bildungsrate von Pyren-Excimeren. Weiterhin untersuchten sie die Mikroviskosität in Mizellen durch Messungen der intramolekularen Excimerbildung

von Dipyrenylpropan.

Correll et al. [8] untersuchten die Interaktionen von Pyren, Pyrensulfonsäure, Pyrenbutansäure und Pyranin in inversen Mizellen des Typs Dodecylammoniumpropionat in Cyclohexan in Gegenwart von cosolubilisiertem Wasser. Wegen unterschiedlicher Hydrophobizitäten dieser Pyrenderivate ordnen sich die Proben in verschiedenen Bereichen der inversen Mizellen an. Pyranin liegt im Kern der inversen Mizellen vor und läßt über Polarisationsmessungen Rückschlüsse auf die im Inneren der Mizelle vorliegenden Viskositäten zu. Wenn alle vorhandenen Wassermoleküle das Pyraninmolekül hydratisieren, ist die Mikroviskosität ziemlich hoch. Zudem interagiert in diesem Fall das anionische Pyranin elektrostatisch mit den kationischen Kopfgruppen des eingesetzten Tensids. Mit zunehmendem Wassergehalt der inversen Mizellen steigt der Anteil von freiem Wasser, daher wird die Probe mobiler und zeigt zunehmend niedrigere Mikroviskositäten an.

Inverse Mizellen von AOT mit unterschiedlichen Verhältnissen von Wasser und Tensid wurden durch Intensitäts- und Anisotropieabklingmessungen von Kresylviolett vermessen [25]. In allen Fällen ergab sich monoexponentielles Intensitätsabklingverhalten, sowie biexponentielles Anisotropieabklingverhalten. Bei einem Konzentrationsverhältnis von Wasser zu Tensid von kleiner 10 wird eine Rotationskorrelationszeit als Maß für die interne Rotation der Probe innerhalb der Mizelle angesehen. Die zweite längere Korrelationszeit beschreibt die Gesamtrotation der Mizelle.

McCarroll et al. [26] haben zeitaufgelöst das Anisotropieabklingverhalten von Perylen in wäßrigen Triton X-114 Lösungen mit zugesetztem SDS gemessen. Die Rotationsdiffusion von Perylen in diesen Lösungen hat eine Komponente mit sehr kurzer Korrelationszeit von wenigen Pikosekunden. Die Anisotropieabklingkurven zeigen eine Grenzanisotropie r_∞ an, was bedeutet, daß die Bewegung des Fluorophors in der Mizelle gehindert ist. Bei höheren SDS- Konzentrationen stieg die sehr kurze Korrelationszeit etwas an und die Grenzanisotropie nahm stark ab. Dieser Befund wird in Verbindung mit dem Abwandern des Fluorophors ins Mizellinnere gebracht.

Matzinger et al. [3] berichten von zwei Fluorophorproben (HANS und DANS, zwei 2-Aminonaphthalin-6-sulfonatderivate), die in verschiedenen C_x TAB-Mizellen ($x=12, 14$ und 16) jeweils biexponentielles Intensitätsabklingverhalten zeigen. Die Autoren gehen davon aus, daß sich der Anteil (etwa 90 %) der Fluorophore mit kurzer Intensitätsabklingzeit (9.5 ns) in der Sternschicht befindet und der Anteil (etwa 10 %) mit längerer Abklingzeit (19.8 ns) sich im Inneren der Mizelle befindet. Dies liegt daran, daß die Gegenionen der eingesetzten Tenside Bromidionen sind und diese die Fluorophore in der Sternschicht quenchen, ins Innere der Mizellen aber nicht gelangen. Die Möglichkeit, daß das biexponentielle Intensitätsabklingverhalten durch ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Mizellen und Wasser hervorgerufen werden kann, wird dadurch ausgeschlossen, daß einer der beiden Fluorophore (HANS) wasserunlöslich ist und die Abklingzeit von DANS in Wasser weder mit der langen noch mit der kurzen Abklingzeit dieses Fluorophors in Tensidlösungen übereinstimmt. Man würde ein einfach-exponentielles Intensitätsabklingverhalten erwarten, falls der Fluorophor in einer einzigen Region vorliegt.

Das Anisotropieabklingverhalten für die kurze Intensitätsabklingzeit wird als biexponentielle Abklingfunktion modelliert (nach einem Modell, das wobbling-in-a-cone genannt wird) und das Anisotropieverhalten für die lange Intensitätsabklingzeit wird als monoexponentielle Abklingfunktion modelliert. Das Anisotropieabklinggesetz ergibt sich so zu:

$$r(t) = a \cdot r_1(t) + (1 - a) \cdot r_2(t) \quad (1.1)$$

wobei

$$r_1(t) = r_1^{(1)} \exp(-t/\tau_{r1}^{(1)}) + r_2^{(1)} \exp(-t/\tau_{r2}^{(1)}) \quad (1.2)$$

und

$$r_2(t) = r^{(2)} \exp(-t/\tau_r^{(2)}) \quad (1.3)$$

Nun rotiert die Mizelle als Ganzes, was eine zusätzliche Orientierungsrelaxation bewirkt. Die Mizellen sind relativ groß, dadurch ist die Rotationsdiffusion langsam, und nur die Population der Fluorophore im Inneren der Mizelle mit der langsamsten Rotationskorrelationszeit ist betroffen. Weil die Depolarisierung durch Rotationsdiffusion des Fluorophors im Inneren der Mizelle unabhängig von der Orientierungsrelaxation durch Rotation der gesamten Mizelle ist, dürfen die Anisotropieabklingkonstanten dieser beiden Prozesse ($1/\tau_{rCore}$ und $1/\tau_m$) addiert werden und ergeben so die gemessene Anisotropieabklingkonstante $1/\tau_r^{(2)}$.

$$\frac{1}{\tau_r^{(2)}} = \frac{1}{\tau_{rCore}} + \frac{1}{\tau_m} \quad (1.4)$$

Die nach Analyse des Anisotropieabklingverhaltens erhaltene langsame Rotationskorrelationszeit $\tau_r^{(2)}$ für HANS in C₁₂TAB-Mizellen liegt bei 4.8 ns, die für DANS in C₁₂TAB-Mizellen bei 3.6 ns.

Maiti et al. [2] berichten ebenfalls von Fluorophorproben in Mizellen. Ihre Proben sind Nilrot, Cresylviolett, ein Cyaninfarbstoff (DODCl), Rhodamin B und ein lipidgelabeltes Rhodamin. Sie haben das Intensitäts- und Anisotropieabklingverhalten dieser Proben unter anderem in Wasser, Butanol und SDS untersucht. Bis auf Rhodamin B in SDS-Mizellen zeigen alle Fluorophorproben monoexponentielles Intensitätsabklingverhalten. Die Intensitätsabklingdauer liegt bei allen Proben zwischen 1 und 3 ns. Das Anisotropieabklingverhalten in Wasser und Butanol ist bei allen Fluorophoren monoexponentiell, in Mizellen dagegen immer biexponentiell. Die gefundenen Rotationskorrelationszeiten in Butanol liegen zwischen 0.4 und 0.5 ns. Die langsamen Rotationskorrelationszeiten in SDS-Mizellen betragen für Nilrot 1.99 ns, für Cresylviolett 2.05 ns, für DODCl 2.01 ns, für Rhodamin B 2.33 ns und für das lipidgelabelte Rhodamin 3.62 ns.

1.5 Theorie der Fluoreszenzspektroskopie

siehe „Principles of Fluorescence Spectroscopy“ von J. R. Lakowicz [21]

1.5.1 Die Bedeutung der Lebensdauer oder der Abklingdauer

Es werde eine Anzahl Fluoreszenzfarbstoffmoleküle mit einem sehr kurzem Lichtpuls angeregt. Ein Jablonski Diagramm zeigt die Absorption eines Lichtquants im Grundzustand S_0 , die Relaxation zum Grundschnivellniveau des ersten angeregten elektronischen Zustandes S_1 , sowie die möglichen folgenden Prozesse Fluoreszenz und über einen Tripletzustand zustandekommende Phosphoreszenz zum Grundzustand S_0 .

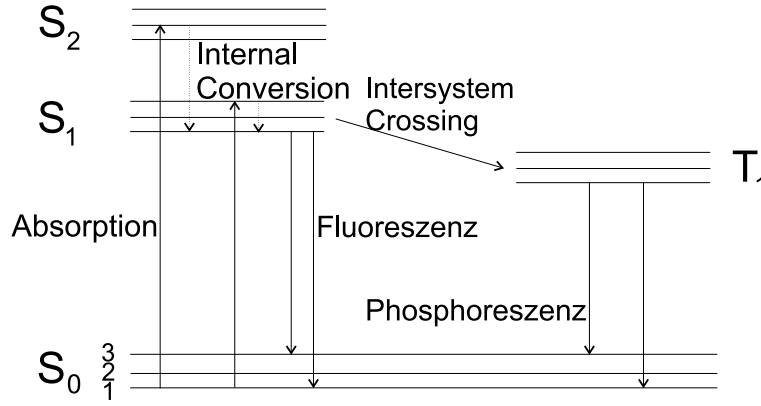


Abbildung 1.6: Ein Jablonski-Diagramm

Die Zahl der Fluorophore im angeregten Zustand (n_0) klingt mit einer Geschwindigkeitskonstante ($k_{\text{rad}} + k_{\text{nonrad}}$) nach folgender Gleichung ab:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(k_{\text{rad}} + k_{\text{nonrad}}) \cdot n(t) \quad (1.5)$$

$n(t)$ sei die Anzahl der angeregten Moleküle zur Zeit t nach der Anregung, k_{rad} ist die Emissionsgeschwindigkeitskonstante und k_{nonrad} ist die Geschwindigkeitskonstante der strahlungslosen Relaxation. Die Emission ist ein zufälliges Ereignis und jeder angeregte Fluorophor emittiert mit der gleichen Wahrscheinlichkeit innerhalb einer gegebenen Zeitspanne. Damit ergibt sich eine exponentielle Abklingkurve der angeregten Population mit

$$n(t) = n_0 e^{-t \cdot (k_{\text{rad}} + k_{\text{nonrad}})} \quad (1.6)$$

In einem Experiment werden nicht die Zahl der angeregten Moleküle, sondern die Fluoreszenzintensität verfolgt, die proportional zu $n(t)$ ist. Daher lässt sich in obiger Gleichung die Zahl der angeregten Moleküle $n(t)$ durch die Intensität zur Zeit t , $I(t)$, ersetzen,

$$I(t) = I_0 e^{-t \cdot (k_{\text{rad}} + k_{\text{nonrad}})} \quad (1.7)$$

wobei I_0 die Anfangsintensität ist. Die Lebensdauer τ ist der reziproke Wert der gesamten Abklinggeschwindigkeitskonstanten:

$$\tau = (k_{\text{nonrad}} + k_{\text{rad}})^{-1}. \quad (1.8)$$

So gilt:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (1.9)$$

Generell ist die Lebenszeit die Inverse der Summe der Geschwindigkeitskonstanten, die den angeregten Zustand entvölkern. Dieser Wert kann auf zweierlei Arten erhalten werden: Zum einen entspricht er der Zeit, nach der die Momentanintensität den Wert $1/e$ der Anfangsintensität besitzt. Gebräuchlicher wird die Lebenszeit jedoch aus der Steigung einer Auftragung von $\log I(t)$ gegen t erhalten. Die Lebensdauer ist auch eine mittlere Zeitdauer, die ein Fluorophor nach Anregung im angeregten Zustand verbleibt, falls der Fluorophor einem monoexponentiellen Abklinggesetz gehorcht.

1.5.2 Prinzip der Fluorimetrie in der Frequenzdomäne

Die Fluorimetrie in der Frequenzdomäne benutzt eine intensitätsmodulierte Lichtquelle. Wegen einer Zeitdauer, die zwischen Absorption und Emission liegt, ist die Emission zeitlich verzögert gegenüber der modulierten Anregung. Diese Verzögerung wird als eine Phasenverschiebung (ϕ_ω) beschrieben, die von 0° bis 90° mit größer werdender Modulationsfrequenz ansteigt. Die endliche zeitliche Antwort der Probe resultiert auch in einer Verkleinerung der Emissionsamplitude durch einen Faktor m_ω . Dieser Faktor nimmt mit größer werdender Modulationsfrequenz von 1.0 bis 0 ab. Bei kleiner Anregungsfrequenz folgt die Emission auf die Anregung zeitlich kaum verzögert. Dadurch ist der Phasenwinkel nahe bei 0 und die Modulation nahe bei 1.0 . Wenn die Modulationsfrequenz erhöht wird, hält die endliche Lebenszeit des angeregten Zustandes die Emission davon ab, genau der Anregung zu folgen. Dies resultiert in einer Phasenverschiebung der Emission. Ebenso ergibt sich so eine Verkleinerung der Spitze-Spitze Amplitude der modulierten Emission, die relativ zur modulierten Anregung gemessen wird. Der Phasenwinkel und die Modulation, gemessen über einen weiten Frequenzbereich, stellen die Frequenzantwort der Emission dar. Das Aussehen der Frequenzantwort hängt ab von der Anzahl der Abklingzeiten, die die Probe zeigt. Falls die Abklingzeit einfach exponentiell ist, ist die Frequenzantwort einfach. Man kann die Abklingzeit aus dem Phasenwinkel oder der Modulation bei jeder Meßfrequenz berechnen. Für ein einfach exponentielles Abklingverhalten sind die Phase und die Modulation mit der Abklingzeit τ durch

$$\tan \phi_\omega = \omega \tau \quad (1.10)$$

und

$$m_\omega = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \quad (1.11)$$

verknüpft. Die nützlichen Modulationsfrequenzen sind nun die, bei denen der Phasenwinkel frequenzabhängig ist und die Modulation noch meßbar ist. Die meisten Fluorophore zeigen eine Abklingdauer von ca. 10 ns. Damit sind die Modulationsfrequenzen typischerweise in der Größenordnung von 1 bis 200 MHz.

1.5.3 Abklingzeitmessungen in der Frequenzdomäne

Mißt man die Fluoreszenzabklingzeit einer Probe in der Frequenzdomäne, so nimmt man einen Vergleich zwischen seiner Emission zu Streulicht vor. Daher haben Fluorimeter, die

in der Frequenzdomäne arbeiten, typischerweise zwei Detektoren, einen für die Probe und einen, der als Zeitreferenz dient. Der Referenzphotomultiplier detektiert normalerweise gestreutes Licht und der Probenphotomultiplier zur Kalibrierung ebenfalls Streulicht und später für eigentliche Messungen Fluoreszenzlicht. Nachdem alles andere in den Messungen gleich bleibt, werden Unterschiede in der relativen Phase oder in der Modulation durch das Abklingverhalten der Probe hervorgerufen. Alle Messungen werden relativ zum Referenzphotomultiplier vorgenommen. Zunächst misst man die Phasenverschiebung zwischen Referenzphotomultipliersignal und dem Probenphotomultipliersignal, wenn letzterer ebenfalls Streulicht detektiert. Diese beiden Signale sind durch einen zufälligen Phasenwinkel ϕ_1 voneinander versetzt, siehe Abbildung 1.7. Diese Phasenverschiebung ist durch die unterschiedlichen Längen der Lichtwege und durch Zeitverzögerungen wegen unterschiedlich langer Kabel erklärbar. Die weiteren Messungen mit Fluorophorlösung ergeben

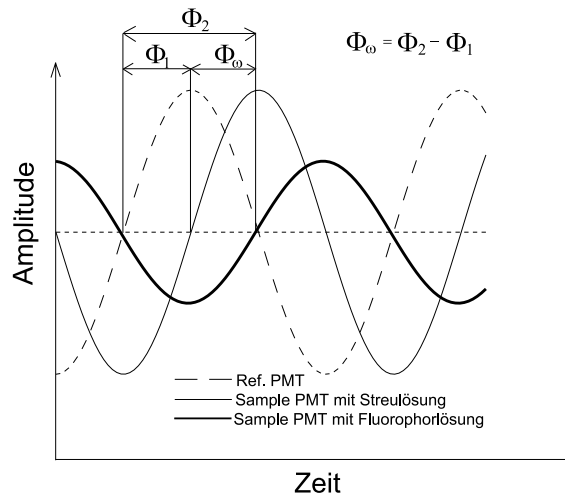


Abbildung 1.7: Bestimmung des zufälligen Phasenwinkels

eine Phasenverschiebung ϕ_2 des Probenmultipliersignals relativ zum Referenzphotomultipliersignal. Dieser Phasenwinkel ϕ_2 beinhaltet sowohl den zufälligen Phasenwinkel ϕ_1 als auch den interessierenden Phasenwinkel ϕ_ω , der durch die Probe hervorgerufen wird. Die Phasenverschiebung errechnet sich aus $\phi_\omega = \phi_2 - \phi_1$.

Die Anregungsmodulation ergibt sich aus dem Verhältnis D/C , wobei C die mittlere Anregungsintensität und D die Hälfte der Spitze - Spitze - Anregungsamplitude darstellt. Die Emissionsmodulation ist ähnlich definiert: A ist die mittlere Emissionsintensität und B die Hälfte der Spitze-Spitze-Emissionsamplitude. Die Modulation der Emission wird relativ zur Modulation der Anregung gemessen: $m = (B/A) / (D/C)$, siehe Abbildung 1.8.

Obwohl m ein Demodulierungsfaktor ist, bezeichnet man ihn üblicherweise als die Modulation. Der andere experimentell gewonnene Wert ist die Phasenverschiebung, der sogenannte Phasenwinkel (ϕ), der üblicherweise aus den Nulldurchgangszeiten der modulierten Komponenten gewonnen wird. Aus dem Phasenwinkel (ϕ) und der Modulation (m) kann die Lebenszeit durch die Gleichungen 1.10 und 1.11 berechnet werden.

Üblicherweise mißt man die Phasenverschiebung und die Modulation über einen großen Bereich von Modulationsfrequenzen des Anregungslichts. Wenn die Modulationsfrequenz

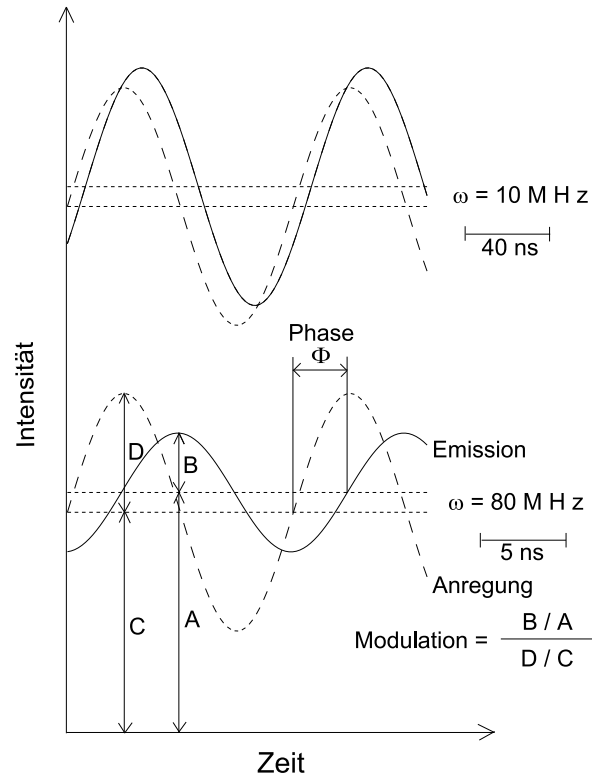


Abbildung 1.8: Bestimmung der Modulation und der Phase in einer Abklingdauermessung

erhöht wird, steigt der gemessene Phasenwinkel von 0 bis auf 90° und die Modulation m sinkt von 100 % bis auf 0 %. Die Meßdaten werden durch nichtlineare least-square Analyse analysiert und eine Fitkurve zu den Meßdaten berechnet. Der sogenannte goodness-of-fit χ_R^2 wird aus der Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Daten ermittelt. Nachdem in der Frequenzdomäne zwei Meßgrößen auftreten, Phase und Modulation, gibt es zwei Sets von Abweichungen. Die Zufälligkeit der Abweichungen zeigt an, ob eine bestimmte mono- oder mehrexponentielle Abklingkurve die Meßdaten erklären kann.

1.5.4 Ausdrücke für die Intensitätsabklingdauer

Man nimmt zunächst an, daß die Probe mit vertikal polarisiertem Licht angeregt wird und die Emission im 90°-Winkel zum Anregungslicht beobachtet wird. Der Emissionspolfilter kann entweder parallel oder senkrecht zur Polarisierung des Anregungslichtes ausgerichtet sein. Dann läßt sich das Intensitätsabklinggesetz als eine Summe des zeitlichen Abklingverhaltens der horizontalen und vertikalen Intensitätskomponente oder als Summe von Exponentialfunktionen beschreiben.

$$I(t) = I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t) \quad (1.12)$$

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} = \sum_i \alpha_i e^{-\Gamma_i t} \quad (1.13)$$

$I(t)$, $I_{||}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ bezeichnen dabei das Abklingverhalten der Gesamtintensität, der parallelen und der senkrechten Komponente der Emission. Man nimmt an, daß die Gesamtintensität sich durch das Multiexponentialmodell beschreiben läßt. α_i sind dabei die präexponentiellen Faktoren, τ_i die Abklingzeiten, $\Gamma_i = \tau_i^{-1}$ die Abklingraten und i die Zahl der Abklingzeiten.

1.5.5 Fluoreszenzabklingdauermessungen mit Ausrichtung der Polfilter unter dem Magic Angle

Für genaue Messungen der Fluoreszenzabklingdauer ist es außerdem notwendig, daß man ein Signal mißt, welches proportional zur Gesamtintensität ist. Diese Intensität ist aber nicht proportional zur Intensität, die man bei paralleler bzw. senkrechter Ausrichtung der Polfilter zueinander mißt. Mit Hilfe von Polfiltern kann die gemessene Intensität proportional zur Gesamtintensität $I_{\text{ges}} = I_{||} + 2 \cdot I_{\perp}$ gemacht werden. Um dies zu erreichen, wird der Anregungspolfilter in die vertikale Position gebracht und der Emissionspolfilter 54.7° aus der vertikalen Position gedreht. Da $I_{||}$ proportional zu $\cos^2 54.7^\circ$ gleich 0.333 ist und $2 \cdot I_{\perp}$ proportional zu $\sin^2 54.7^\circ$ gleich 0.667 ist, ergeben diese Polfilterpositionen, daß I_{\perp} zweifach gezählt wird verglichen mit $I_{||}$ und sich so eine Gesamtintensität $I_{\text{ges}} = I_{||} + 2 \cdot I_{\perp}$ ergibt.

1.5.6 Analyse der Daten des Intensitätsabklingverhaltens

Bei Messungen des Intensitätsabklingverhaltens mißt man üblicherweise unter der magic-angle Bedingung, also vertikale Anregung und Beobachtung unter einem Winkel von 54.7° zur Vertikalen, um den Einfluß von Rotationsdiffusion auf das Abklingverhalten zu vermeiden. Die Meßdaten werden dann nach der Methode nichtlinearer Fehlerquadrate analysiert. Die gemessenen Daten werden mit Werten, die ein bestimmtes Modell voraussagt, verglichen. Die Parameter des Modells werden variiert bis sie eine minimale Abweichung von den Meßdaten ergeben. Diese Daten können für ein bestimmtes Intensitätsabklingverhalten aus der Sinus- und Cosinus-Transformierten der Gesamtintensität $I(t)$ berechnet werden:

$$N_{\omega} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin \omega t dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (1.14)$$

$$D_{\omega} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos \omega t dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (1.15)$$

Dabei ist ω die Kreismodulationsfrequenz, also 2π mal die Modulationsfrequenz in Hertz. Die beiden Ausdrücke sind durch die Gesamtintensität $\int_0^{\infty} I(t) dt$ der Probe normiert. Ist das Intensitätsabklinggesetz eine Summe von Exponentialfunktionen, so sind diese Transformaten durch folgende Ausdrücke gegeben:

$$N_{\omega} = \sum_i \frac{\alpha_i \omega \tau_i^2}{1 + \omega^2 \tau_i^2} / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (1.16)$$

$$D_{\omega} = \sum_i \frac{\alpha_i \omega \tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} / \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (1.17)$$

Die errechneten frequenzabhängigen Werte des Phasenwinkels $\phi_{c\omega}$ und der Modulation $m_{c\omega}$ sind durch die beiden folgenden Gleichungen gegeben:

$$\tan \phi_{c\omega} = \frac{N_{\omega}}{D_{\omega}} \quad (1.18)$$

$$m_{c\omega} = \sqrt{N_{\omega}^2 + D_{\omega}^2} \quad (1.19)$$

Die Parameter α_i und τ_i werden variiert, bis sie den besten Fit zwischen den Meßdaten und den errechneten Werten ergeben. Dieser beste Fit wird durch ein Minimum von χ_R^2 , dem sogenannten goodness-of-fit, angezeigt:

$$\chi_R^2 = \frac{1}{v} \sum_{\omega} \left(\frac{\phi_{\omega} - \phi_{c\omega}}{\delta\phi} \right)^2 + \frac{1}{v} \sum_{\omega} \left(\frac{m_{\omega} - m_{c\omega}}{\delta m} \right)^2 \quad (1.20)$$

v ist dabei die Anzahl der Freiheitsgrade und $\delta\phi$ und δm sind die experimentellen Standardabweichungen der Phase und der Modulation. v ist die Anzahl der Messungen, die durch die doppelte Anzahl der Meßfrequenzen minus der Anzahl der variablen Parameter bestimmt ist. Man vergleicht den χ_R^2 Wert für mono-, bi-, und triexponentielle Fits. Falls χ_R^2 um mehr als die Hälfte sinkt, wenn das Modell erhöht wird, kann möglicherweise die Einführung einer zusätzlichen Abklingzeit die Meßdaten erklären.

1.5.7 Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie

Nach Anregung mit polarisiertem Licht ist die Emission von vielen Fluorophorproben ebenfalls polarisiert. Das Ausmaß dieser Polarisierung wird durch den Begriff Anisotropie (r) beschrieben. Proben, deren Anisotropie von null verschieden ist, haben eine polarisierte Emission. Dieses Phänomen basiert auf dem Vorhandensein von Übergangsmomenten für Absorption und Emission, die in spezifischen Richtungen innerhalb der Fluorophorstruktur liegen. In homogener Lösung sind die Fluorophore, die sich im Grundzustand befinden, zufällig orientiert. Strahlt man linear polarisiertes Licht in eine isotrope Probe mit willkürlicher Orientierung der Fluorophore ein, so werden nur diejenigen Moleküle optisch angeregt, deren Übergangsmoment eine Komponente in Richtung des elektrischen Feldvektors des Anregungsstrahls besitzen. Aus einer isotropen Verteilung der Moleküle im Grundzustand folgt also durch Anregung mit linear polarisiertem Licht eine anisotrope Verteilung der Moleküle im angeregten Zustand. Dieses Verhalten bezeichnet man als PhotoSelektion; die Folge ist eine polarisierte Emission. Die Emission kann durch verschiedene Prozesse depolarisiert werden, von denen der wichtigste die Rotationsdiffusion des Fluorophors ist. Anisotropiemessungen erlauben eine Aussage über die durchschnittliche Winkelauslenkung (Rotation) des Fluorophors zwischen Absorption und nachfolgender Emission eines Photons. Dieses Ausmaß diffusiver Bewegungen ist abhängig von der Viskosität des Solvens und der Größe und Form der diffundierenden Spezies. Zum Beispiel gilt für kleine Fluorophore in Lösungsmitteln niedriger Viskosität, daß die Rate der Rotationsdiffusion schneller als die Rate der Emission ist. Unter diesen Bedingungen ist die Emission depolarisiert und die Anisotropie liegt nahe bei null.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie von der Rotationsbewegung wird in dieser Arbeit verwendet, um Aussagen über die Größe und Gestalt von fluorophormarkierten Mizellen in Wasser als Lösungsmittel treffen zu können.

1.5.8 Definition der Fluoreszenzanisotropie

Die Anisotropie eines emittierten Lichtstrahls ist definiert als das Intensitätsverhältnis der polarisierten Komponente zur Gesamtintensität. Nimmt man an, die Anregung sei parallel zur (vertikalen) z-Achse polarisiert, so ist die Dipolemission der Fluorophore auch symmetrisch zur z-Achse. Das bedeutet, daß $I_y = I_x$. Der „Überhang“ der Emissionsintensität entlang der z-Achse (I_z) gegenüber der Emissionsintensität entlang der y-Achse (I_y) ist die Intensität der polarisierten Komponente. Diese wird normiert durch die Gesamtintensität, welche sich aus den Intensitäten entlang aller Achsen zusammensetzt ($I_{\text{ges}} = I_x + I_y + I_z$). Die Intensität der Emission entlang der y-Achse steht senkrecht zur ursprünglichen Anregungsrichtung ($I_y = I_{\perp}$) und die Intensität der Emission entlang der z-Achse steht zur ihr parallel ($I_z = I_{\parallel}$). Daher gilt

$$r = \frac{I_z - I_y}{I_x + I_y + I_z} = \frac{I_z - I_y}{I_{\text{ges}}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad (1.21)$$

Für vollständig polarisiertes Licht ist $I_{\perp} = 0$ und $r = 1$. Diesen Wert findet man für Streulicht, jedoch nie für Fluorophore in Lösung. Hier ergeben sich aufgrund der Winkelabhängigkeit der PhotoSelektion niedrigere Werte.

1.5.9 Theorie der Anisotropie

Die Theorie der Anisotropie kann aus einer Betrachtung eines einzelnen Fluorophormoleküls abgeleitet werden. Zunächst nimmt man an, daß im Molekül die Übergangsdipolmomente von Absorption und Emission parallel zueinander sind. Dann nimmt man an, daß dieses Molekül einen Winkel θ mit der z-Achse und einen Winkel ϕ mit der y-Achse einschließt, wie in Abbildung 1.9 gezeigt. Nun soll die Anisotropie berechnet werden, die man für dieses Molekül beobachten würde, wenn keine Rotationsdiffusion erfolgt. Die Bedingungen parallele Dipole, Immobilität und zufällige Orientierung im Grundzustand erleichtern die Herleitung. Es ist bekannt, daß strahlende Fluorophore sich wie emittierende Dipole verhalten. Die Intensität der Strahlung, die von einem Dipol ausgeht, ist proportional zum Quadrat seines Vektors projiziert auf eine Beobachtungsachse. Die Intensität, die durch einen Polfilter beobachtet werden kann, ist proportional zum Quadrat der Projektion des elektrischen Feldes des strahlenden Dipols auf die Transmissionsachse des Polfilters. Diese Projektionen sind durch

$$I_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos^2 \theta \quad (1.22)$$

und

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2 \theta \sin^2 \phi \quad (1.23)$$

gegeben.

In einem Experiment enthält die Lösung viele Moleküle mit einer zufälligen Anordnung. Die Anisotropie wird erhalten, indem man einen Mittelwert errechnet, der sich wegen der PhotoSelektion durch die Anregung mit polarisiertem Licht und wie die ausgewählten Moleküle zur gemessenen Intensität beitragen, ergibt. Es soll eine Anregung mit vertikal polarisiertem Licht, also polarisiertes Licht parallel zur z-Achse, betrachtet werden. Diese Anregung regt alle Moleküle mit gleicher Wahrscheinlichkeit an, die einen Winkel ϕ mit der y-Achse einschließen. Das bedeutet, daß die Population der angeregten Fluorophore

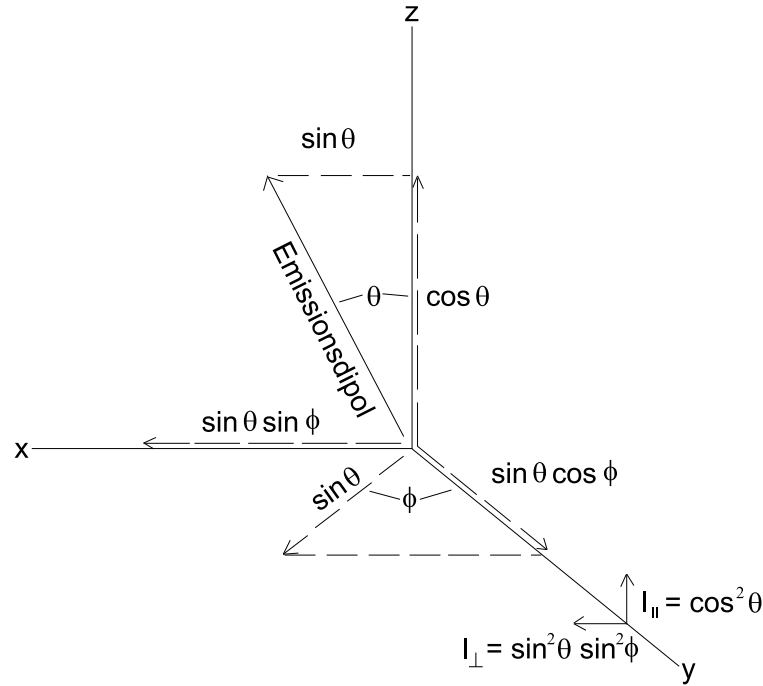


Abbildung 1.9: Emissionsintensität eines Fluorophormoleküls in einem Koordinatensystem

symmetrisch um die z-Achse verteilt ist. Eine zufällige Anordnung von Molekülen wird zwischen den ϕ -Werten 0 bis 2π gleiche Wahrscheinlichkeit besitzen. Man kann deswegen die ϕ -Abhängigkeit in der letzten Formel durch den Mittelwert von $\sin^2\phi$ ersetzen. Dieser Wert ist durch

$$\langle \sin^2 \phi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2 \phi d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} \quad (1.24)$$

gegeben. Deswegen gilt

$$I_{\parallel}(\theta) = \cos^2 \theta \quad (1.25)$$

und

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \frac{1}{2} \sin^2 \theta. \quad (1.26)$$

Jetzt soll eine Ansammlung von Fluorophoren betrachtet werden, die zur z-Achse mit einer Wahrscheinlichkeit von $f(\theta)$ angeordnet ist. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für diese Ansammlung von Molekülen ist dann

$$I_{\parallel} = \int_0^{\pi/2} f(\theta) \cos^2 \theta d\theta = k \langle \cos^2 \theta \rangle \quad (1.27)$$

und

$$I_{\perp} = \frac{1}{2} \int_0^{\pi/2} f(\theta) \sin^2 \theta d\theta = \frac{k}{2} \langle \sin^2 \theta \rangle. \quad (1.28)$$

$f(\theta)d\theta$ ist dabei die Wahrscheinlichkeit, daß ein Fluorophor zwischen θ und $\theta+d\theta$ angeordnet ist, und k ist eine Konstante. Mit Gleichung 1.21 und der Identität $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$

ergibt sich

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (1.29)$$

Hier zeigt sich, daß die Anisotropie durch den Mittelwert von $\cos^2 \theta$ bestimmt ist. θ ist dabei der Winkel, den der Emissionsdipol mit der z-Achse einschließt.

Die Anregung mit linear polarisiertem Licht resultiert in einer Population angeregter Moleküle, die symmetrisch um die z-Achse verteilt sind. Der elektrische Dipol eines Fluoreszenzmoleküls braucht dabei nicht genau zur z-Achse ausgerichtet sein, um Licht, das entlang dieser Achse polarisiert ist, zu absorbieren. Die Absorptionswahrscheinlichkeit ist dabei proportional zu $\cos^2 \theta$, wobei θ der Winkel ist, den der Absorptionsdipol mit der z-Achse einschließt. Dieses Phänomen wird Photos Selektion genannt. Die Population im angeregten Zustand ist symmetrisch um die z-Achse ausgerichtet. Für eine zufällige Verteilung der Moleküle im Grundzustand gilt, daß die Zahl der Moleküle in einem Winkel zwischen θ und $\theta + d\theta$ proportional zu $\sin \theta d\theta$ ist. Diese Größe ist proportional zu einer Kugeloberfläche innerhalb der Winkel θ und $\theta + d\theta$. Die Verteilung der Moleküle, die durch vertikal polarisiertes Licht angeregt werden, ist durch

$$f(\theta)d\theta = \cos^2 \theta \sin \theta d\theta \quad (1.30)$$

gegeben. Die Anisotropie ist eine Funktion von $\langle \cos^2 \theta \rangle$, siehe Gleichung 1.29; damit ergibt eine Berechnung von $\langle \cos^2 \theta \rangle$ die Anisotropie. Wenn die Übergangsdipolmomente zwischen Absorption und Emission zueinander kollinear sind, ergibt sich der Maximalwert von $\langle \cos^2 \theta \rangle$ zu 0.6. Setzt man diesen Wert in Gleichung 1.29 ein, so ergibt sich ein Wert von 0.4 als Maximalwert der Anisotropie. Man findet diesen Wert, wenn die Übergangsdipolmomente zwischen Absorption und Emission zueinander kollinear sind und keine Depolarisierungsprozesse stattfinden. Unter diesen Bedingungen ist die Population im angeregten Zustand vornehmlich um die z-Achse herum angeordnet und der Wert für I_{\perp} ein Drittel des Wertes von I_{\parallel} .

1.5.10 Das Anregungsanisotropiespektrum

Zunächst vermutet man, daß die Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmomente zueinander kollinear sind, tatsächlich zeigen nur wenige Fluorophore einen Wert für die sogenannte Fundamentalanisotropie von 0.4, was damit gleichbedeutend ist. Für die meisten immobilisierten Fluorophore gilt, daß die gemessenen Anisotropiewerte kleiner als 0.4 sind und sie generell von der Anregungswellenlänge abhängen. Dieser Befund wird dadurch erklärt, daß die Übergangsdipolmomente von Absorption und Emission einen Winkel β einschließen. Nach Gleichung 1.29 gilt, daß die Drehung des Emissionsdipolmomentes um einen Winkel θ von der z-Achse eine Verkleinerung der Anisotropie durch einen Faktor von $(3 \cos^2 \theta - 1)/2$ mit sich bringt. Genauso bringt ein Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment von Absorption und Emission eine weitere Verkleinerung der gemessenen Anisotropie mit sich. Die beobachtete Anisotropie in verdünnter glasartiger Lösung ist ein Produkt aus dem Anisotropieverlust durch Photos Selektion (der die gemessene Anisotropie um den Faktor $\frac{2}{5}$ reduziert) und aus dem Winkel zwischen dem Absorptions- und

Emissionsdipolmoment. So ergibt sich die Fundamentalanisotropie eines Fluorophors zu

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right). \quad (1.31)$$

Der Term r_0 wird benutzt, um anzuzeigen, daß die Anisotropie in Abwesenheit von depolarisierenden Prozessen wie Rotationsdiffusion oder Energietransfer gemessen wird. Für einige Moleküle liegt der Wert für β nahe bei null. Dadurch ergeben sich r_0 -Werte bis zu 0.40. Messungen der Fundamentalanisotropie r_0 brauchen besondere Bedingungen. Um Rotationsdiffusion zu vermeiden, werden die Proben in Lösungsmitteln untersucht, die bei niedrigen Temperaturen (ca. -70°C) ein klares Glas bilden, wie Propylenglykol oder Glycerin. Zusätzlich müssen die Lösungen optisch verdünnt sein, um Depolarisation durch Reabsorption oder durch Resonanztransfer zu vermeiden.

Das Anisotropiespektrum ist eine Auftragung der gemessenen Anisotropie gegen die Anregungswellenlänge für einen bestimmten Fluorophor in verdünnter glasartiger Lösung. Die Anisotropie ist generell unabhängig von der Emissionswellenlänge, weil die Emission normalerweise vom niedrigsten Singlettzustand ausgeht.

Die größten r_0 -Werte werden für das langstwellige Absorptionsband beobachtet. Es liegt daran, daß der niedrigste Singlettzustand für die Fluoreszenz verantwortlich ist und dieser Zustand auch für das langstwellige Absorptionsband zuständig ist. Dadurch haben Absorption und Emission den gleichen elektronischen Übergang und nahezu kollineare Übergangsmomente.

1.5.11 Ausdrücke für die Anisotropieabklingdauer

Die Anisotropieabklingdauer läßt sich, ebenso wie die Intensitätsabklingdauer, als Summe von Exponentialfunktionen ausdrücken.

$$r(t) = \sum_j r_0 g_j e^{-t/\Theta_j} = \sum_j r_{0j} e^{-6R_j t} \quad (1.32)$$

$\Theta_j = (6R_j)^{-1}$ sind die Rotationskorrelationszeiten, R_j die Rotationsdiffusionskonstanten, g_j ist der Anteil an den Amplituden der einzelnen Komponenten der Anisotropie mit ($\sum_j g_j = 1.0$), $r_{0j} = r_0 g_j$ sind die Amplituden der einzelnen Komponenten der Anisotropie und r_0 ist die Gesamtanisotropie zur Zeit $t = 0$.

Die polarisierten Komponenten der Emission sind mit der Anisotropieabklingdauer durch

$$I_{||}(t) = 1/3 I(t) [1 + 2r(t)] \quad (1.33)$$

$$I_{\perp}(t) = 1/3 I(t) [1 - r(t)] \quad (1.34)$$

verknüpft.

1.5.12 Messung der Abklingdauer der Anisotropie

Die Probe wird mit amplitudenmoduliertem Licht angeregt, das vertikal polarisiert ist. Die Emission wird durch einen Polfilter beobachtet, der zwischen der parallelen und der

senkrechten Orientierung gedreht wird. Dabei wird die Phasendifferenz Δ_ω bei der Modulationsfrequenz ω zwischen der senkrechten (ϕ_\perp) und der parallelen (ϕ_\parallel) Komponente der Emission

$$\Delta_\omega = \phi_\perp - \phi_\parallel \quad (1.35)$$

gemessen. Ein weiterer Meßwert ist das Amplitudenverhältnis Λ_ω der parallelen (AC_\parallel) und der senkrechten (AC_\perp) Komponente der modulierten Emission.

$$\Lambda_\omega = AC_\parallel / AC_\perp. \quad (1.36)$$

Das Amplitudenverhältnis Λ_ω wird dann umgerechnet in die frequenzabhängige Anisotropie r_ω , die definiert ist durch

$$r_\omega = \frac{\Lambda_\omega - 1}{\Lambda_\omega + 2}. \quad (1.37)$$

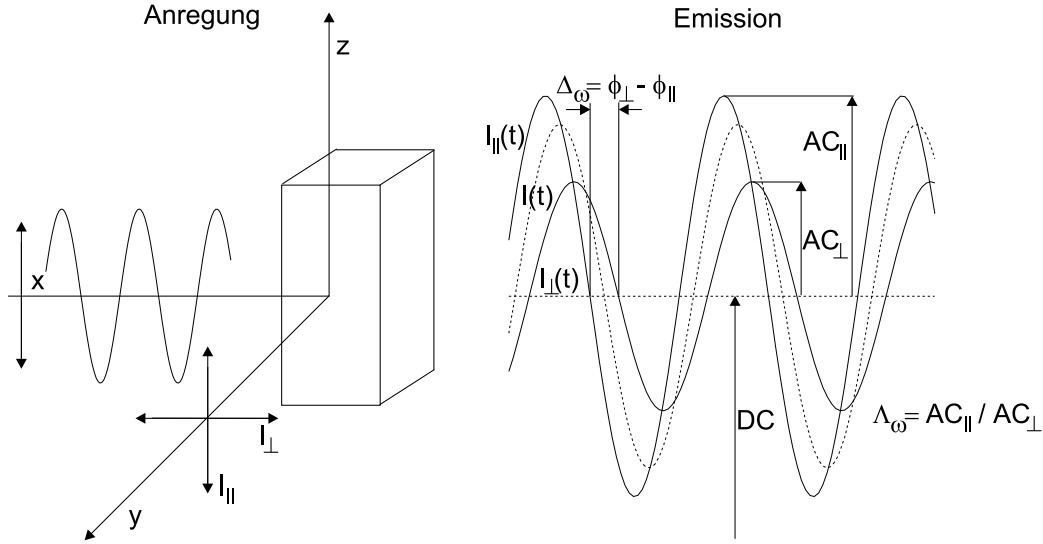


Abbildung 1.10: Messung der Anisotropieabklingzeiten nach der FD-Methode. Die durchschnittliche Intensität wird hier der Einfachheit halber für beide polarisierten Komponenten als gleich angenommen.

Man mißt nun die Phase und die Amplitude der beiden polarisierten Komponenten. Man findet, daß der Phasenwinkel der parallelen Komponente (ϕ_\parallel) kleiner ist als der Phasenwinkel, der unter magic angle Bedingungen, also proportional zur Gesamtintensität, gemessen wird. Ebenso ist die Amplitude der parallelen Komponente (AC_\parallel) größer als die Amplitude, die unter magic angle Bedingungen gemessen wird. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die vertikal polarisierte Komponente schneller abklingt als die unter magic angle Bedingungen gemessene Gesamtintensität. Der Phasenwinkel der senkrechten Komponente (ϕ_\perp) ist größer und die Amplitude (AC_\perp) ist kleiner, weil diese Komponente bevölkert wird durch die ursprünglich in vertikaler Richtung angeregten Komponente. Damit ergibt sich eine längere Abklingdauer der senkrechten Komponente. Man mißt nun separat ϕ_\parallel , ϕ_\perp , AC_\parallel und AC_\perp und ermittelt daraus die Phasendifferenz $\Delta_\omega = \phi_\perp - \phi_\parallel$ zwischen den beiden polarisierten und modulierten Komponenten der Emission und das Verhältnis ihrer Amplituden $\Lambda_\omega = AC_\parallel / AC_\perp$ (siehe Abbildung 1.10). Zusätzlich wird das Intensitätsabklingverhalten in einer separaten Messung der Phase und der Modulation

der Gesamtintensität relativ zur modulierten Anregung unter magic angle Bedingungen bestimmt.

Messung der Abklingdauer der Anisotropie erfordert die Kenntnis der Abklingdauer der Gesamtintensität der Emission und die Differenz zwischen der Abklingdauer der vertikalen und der horizontalen Komponente der Emission. Zuerst mißt man die Abklingdauer unter der magic angle Bedingung. Die dadurch erhaltenen Daten benutzt man, um die Parameter α und τ des Abklinggesetzes nach Gleichung 1.13 zu bestimmen. Diese Parameter werden in der nachfolgenden Messung konstant gehalten. Die zweite Messung ist dann eine Messung der Differenz oder des Quotienten der polarisierten Komponenten der Emission, um damit Δ_ω und Λ_ω zu bestimmen. Mit diesen Daten stellt man dann das Anisotropieabklinggesetz nach Gleichung 1.32 auf.

1.5.13 Analyse der Anisotropieabklingdaten

Die Analyse der Anisotropieabklingdaten wird ähnlich wie eine Analyse der Intensitätsabklingdaten durchgeführt. Die Beziehung zwischen den Daten (Δ_ω und Λ_ω) und ihren Transformaten ist etwas komplexer. Die erwarteten Werte von Δ_ω ($\Delta_{c\omega}$) und Λ_ω ($\Lambda_{c\omega}$) können aus einer Sinus- und Cosinustransformierung der einzelnen polarisierten Abklingverhalten erhalten werden. Die experimentellen Größen, aus denen das Anisotropieabklingverhalten bestimmt werden soll, sind der Phasenwinkelunterschied zwischen der horizontalen und der vertikalen Komponente der polarisierten Emission

$$\Delta_\omega = \phi_\perp - \phi_\parallel \quad (1.38)$$

$$\Delta_{c\omega} = \arctan \left(\frac{D_\parallel N_\perp - N_\parallel D_\perp}{N_\parallel N_\perp + D_\parallel D_\perp} \right) \quad (1.39)$$

und das Verhältnis der vertikalen und horizontalen Amplitude der modulierten Emission

$$\Lambda_\omega = \frac{AC_\parallel}{AC_\perp} \quad (1.40)$$

$$\Lambda_{c\omega} = \frac{\sqrt{N_\parallel^2 + D_\parallel^2}}{\sqrt{N_\perp^2 + D_\perp^2}}. \quad (1.41)$$

Dabei bedeuten

$$N_\parallel = \int_0^\infty I_\parallel(t) \sin \omega t dt \quad (1.42)$$

$$N_\perp = \int_0^\infty I_\perp(t) \sin \omega t dt \quad (1.43)$$

$$D_\parallel = \int_0^\infty I_\parallel(t) \cos \omega t dt \quad (1.44)$$

$$D_\perp = \int_0^\infty I_\perp(t) \cos \omega t dt. \quad (1.45)$$

Die Werte von N_\parallel , N_\perp , D_\parallel und D_\perp werden dabei nicht durch den Wert für die Gesamtintensität normiert, wie dies der Fall bei der Bestimmung des Intensitätsabklinggesetzes ist.

Die Parameter, die nach Gleichung 1.32 die Anisotropieabklingdauer beschreiben, werden aus den Meßdaten durch Analyse nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate erhalten. Das Kriterium hierfür ist ein Minimum der Abweichung der errechneten Werte von den Meßergebnissen.

$$\chi_R^2 = \frac{1}{v} \sum_{\omega} \left(\frac{\Delta_{\omega} - \Delta_{c\omega}}{\delta\Delta} \right)^2 + \frac{1}{v} \sum_{\omega} \left(\frac{\Lambda_{\omega} - \Lambda_{c\omega}}{\delta\Lambda} \right)^2 \quad (1.46)$$

Dabei bedeuten $\delta\Delta$ und $\delta\Lambda$ die angenommenen Fehler in den Meßergebnissen und v ist die Anzahl der Freiheitsgrade. Man gibt sich die Fehler $\delta\Delta$ und $\delta\Lambda$ so vor, daß die Phasenwindkeldifferenz zwischen der horizontalen und der vertikalen Komponente der polarisierten Emission (Δ_{ω}) und das Verhältnis der vertikalen und horizontalen Amplitude der modulierten Emission (Λ_{ω}) ungefähr gleich gewichtet werden.

1.5.14 Modelle für ein bestimmtes Anisotropieabklingverhalten

nach Literaturstelle [27]

Berechnung von Δ_{ω} und Λ_{ω} erfordert die Kenntnis von $N_{||}$, N_{\perp} , $D_{||}$ und D_{\perp} . Diese Terme ergeben sich zu

$$N_{||} = \frac{1}{3}(A + 2B) \quad (1.47)$$

$$N_{\perp} = (A - B) \quad (1.48)$$

$$D_{||} = \frac{1}{3}(C + 2D) \quad (1.49)$$

$$D_{\perp} = \frac{1}{3}(C - D) \quad (1.50)$$

Dabei sind

$$A = \sum_i \frac{\alpha_i \omega}{\omega^2 + \Gamma_i^2} \quad (1.51)$$

$$B = \sum_i \alpha_i \omega \sum_j \frac{r_{0j}}{\omega^2 + (\Gamma_i + 6R_j)^2} \quad (1.52)$$

$$C = \sum_i \frac{\alpha_i \Gamma_i}{\omega^2 + \Gamma_i^2} \quad (1.53)$$

$$D = \sum_i \alpha_i \sum_j \frac{r_{0j}(\Gamma_i + 6R_j)}{\omega^2 + (\Gamma_i + 6R_j)^2}. \quad (1.54)$$

Bei einfach exponentiellen Intensitäts- und Anisotropieabklingverhalten ergibt sich so:

$$N_{||} = \frac{1}{3} \left[\frac{\omega}{(\omega^2 + \Gamma^2)} + \frac{2r_0\omega}{\omega^2 + (\Gamma + 6R)^2} \right] \quad (1.55)$$

$$N_{\perp} = \frac{1}{3} \left[\frac{\omega}{(\omega^2 + \Gamma^2)} - \frac{r_0\omega}{\omega^2 + (\Gamma + 6R)^2} \right] \quad (1.56)$$

$$D_{||} = \frac{1}{3} \left[\frac{\Gamma}{(\omega^2 + \Gamma^2)} + \frac{2r_0(\Gamma + 6R)}{\omega^2 + (\Gamma + 6R)^2} \right] \quad (1.57)$$

$$D_{\perp} = \frac{1}{3} \left[\frac{\Gamma}{(\omega^2 + \Gamma^2)} - \frac{r_0(\Gamma + 6R)}{\omega^2 + (\Gamma + 6R)^2} \right] \quad (1.58)$$

Oftmals sind jedoch die Anisotropieverhalten multiexponentiell, man kann jedoch dieses Modell als Einstieg für eine Analyse durch multiexponentielle Modelle benutzen. Für die Analyse von komplexen Anisotropieabklingverhalten ist zu beachten, daß Korrelation zwischen den Parametern auftreten kann. Das bedeutet, daß zwei Parameter sich ändern können, ohne daß sich der Wert von χ_R^2 ändert.

1.5.15 Der Einfluß der Rotationsdiffusion auf die Fluoreszenzanisotropien von sphärischen Rotoren: Die Perrin-Gleichung

Rotationsdiffusion von Fluorophoren ist eine dominierende Ursache von Fluoreszenzdepolarisierung. Diese Art von Depolarisierung wird im einfachsten Fall für sphärische Rotoren durch die Perrin-Gleichung beschrieben:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} = 1 + 6D\tau \quad (1.59)$$

τ ist dabei die Fluoreszenzabklingzeit, θ die Rotationskorrelationszeit und D der Rotationsdiffusionskoeffizient. Falls die Rotationskorrelationszeit viel größer als die Abklingzeit ist, ($\theta \gg \tau$) ist die gemessene Anisotropie r gleich der Fundamentalanisotropie r_0 . Falls die Rotationskorrelationszeit viel kürzer ist als die Abklingzeit, ($\theta \ll \tau$) ist die gemessene Anisotropie null. Das Abklingverhalten der Anisotropie eines sphärischen Moleküls ist einfach exponentiell.

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} = r_0 e^{-6Dt} \quad (1.60)$$

In dieser Gleichung ist die Rotationskorrelationszeit θ eines Fluorophors durch die Stokes-Einstein Gleichung bestimmt:

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \quad (1.61)$$

Dabei bedeutet η die dynamische Viskosität des Lösungsmittels, V das Volumen einer Kugel, R die Gaskonstante und T die Temperatur in Kelvin. Die Rotationskorrelationszeit ist mit dem Rotationsdiffusionskoeffizienten durch $\theta = (6D)^{-1}$ verknüpft. Nur sphärische Moleküle zeigen ein einfach-exponentielles Anisotropieabklingverhalten.

1.5.16 Rotationsdiffusion von nicht-sphärischen Molekülen

Ein rotierender Fluorophor braucht nicht symmetrisch bezüglich irgendeiner Achse durch das Molekül zu sein. Diese total unsymmetrische Gestalt läßt sich nur durch die Gestalt selbst beschreiben, was für eine allgemeine Theorie wenig hilfreich ist. Ein nichtsphärisches Molekül wird entweder als allgemeiner Ellipsoid oder als prolater oder oblater Ellipsoid beschrieben. Ein allgemeiner Ellipsoid hat drei ungleiche Halbachsen $a \neq b \neq c$ und ein prolater oder oblater Ellipsoid hat zwei gleiche und eine besondere Achse $a \neq b = c$. Die Rotationseigenschaften von Ellipsoiden werden durch Rotationsdiffusionskoeffizienten um jede Achse beschrieben (D_1 , D_2 und D_3).

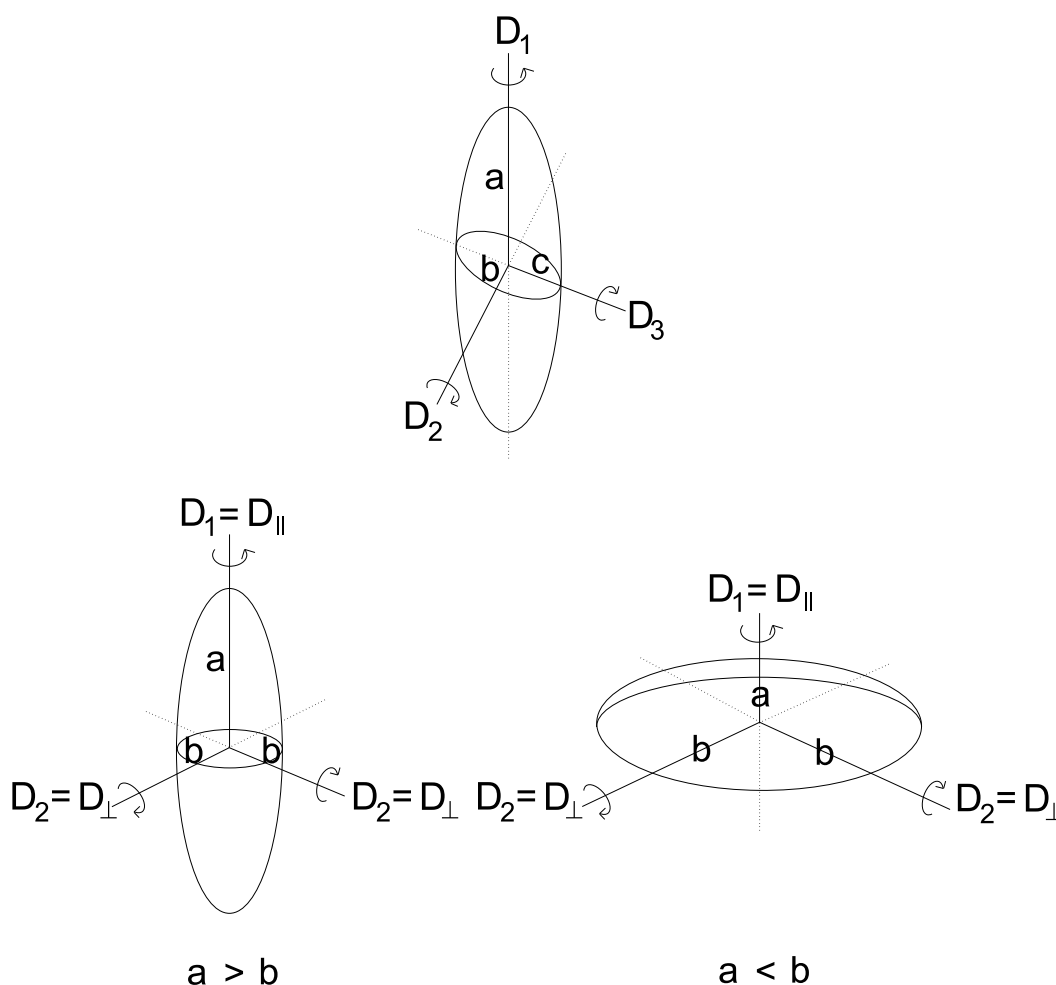


Abbildung 1.11: oben: allgemeines Ellipsoid mit drei ungleichen Halbachsen $a \neq b \neq c$; links unten: prolateres Ellipsoid mit $a > b = c$; rechts unten: oblateres Ellipsoid mit $a < b = c$

1.5.17 Das Anisotropieabklingverhalten von nichtsphärischen Molekülen

Aus der Theorie läßt sich das Anisotropieabklingverhalten von Ellipsoiden vorhersagen. Die Rotationskorrelationszeiten im Anisotropieabklinggesetz sind Funktionen der Rotationsdiffusionskoeffizienten. Fast alle Experimente können nicht die Gestalt eines allgemeinen Ellipsoids enthüllen, so daß die meisten Daten mit einem Modell für prolate oder oblate Ellipsoide interpretiert werden. In einem prolaten Ellipsoid ist die besondere Achse länger als die beiden anderen gleichen Achsen ($a > b = c$). Prolate Ellipsoide sind entlang der Symmetrieachse verlängert. In einem oblaten Ellipsoid ist die besondere Achse kürzer als die beiden anderen gleichen Achsen ($a < b = c$). Oblate Ellipsoide sind wie abgeflachte Kugeln geformt. Wegen den beiden gleichen Achsen in prolaten und oblatsen Ellipsoiden kann ihr Bewegungsverhalten mit zwei Diffusionskoeffizienten beschrieben werden. Die Rotation um die besondere Achse wird D_{\parallel} genannt und die Rotation um eine der beiden anderen gleichen Achsen wird mit D_{\perp} bezeichnet. Im allgemeinen erwartet man $D_{\parallel} > D_{\perp}$, weil die

Drehung um die besondere Achse mit weniger Umplazierung von Solvensmolekülen als die Drehung um die beiden anderen Achsen verbunden ist.

Das Anisotropieabklingverhalten von nichtsphärischen Molekülen wird üblicherweise beschrieben nach Modellen für prolata oder oblate Ellipsoide. Das Absorptions- und Emissionsdipolmoment eines Fluorophors kann eine beliebige Richtung relativ zur Hauptachse a und zu den Nebenachsen b haben, siehe Abbildung 1.12. Das Anisotropieabklinggesetz für prolata oder oblate Ellipsoide kann bis zu drei Rotationskorrelationszeiten zeigen, die Funktionen der beiden Rotationsdiffusionskoeffizienten ($D_{||}$ und D_{\perp}) sind. Die Amplituden des Anisotropieabklinggesetzes hängen von der Orientierung der Übergangsdipolmomente ab.

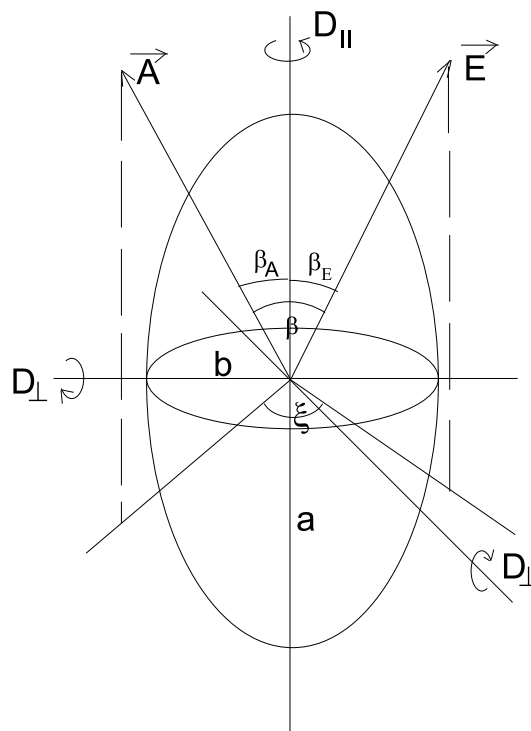


Abbildung 1.12: Absorptionsdipolmoment \vec{A} und Emissionsdipolmoment \vec{E} eines Fluorophors innerhalb eines prolata Ellipsoids

Diese Theorie anzuwenden setzt voraus, daß der Ellipsoid starr ist und daß keine unabhängige Bewegung des Fluorophors innerhalb des Ellipsoids stattfindet. Der Fluorophor darf sich nur innerhalb eines Ellipsoids aufhalten. Wichtig ist ferner, daß die Probe in den Ellipsoiden keine Di- oder Oligomere bildet, die unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften wie die Abklingdauer aufweisen. Deswegen muß darauf geachtet werden, daß das Abklingverhalten einfach exponentiell ist und einer einzigen Spezies zugeordnet werden kann, deren Rotationsverhalten modelliert werden soll. Für prolata oder oblate Ellipsoide erwartet man im Anisotropieabklinggesetz drei Rotationskorrelationszeiten

$$r(t) = r_1 \exp(-t/\theta_1) + r_2 \exp(-t/\theta_2) + r_3 \exp(-t/\theta_3). \quad (1.62)$$

Die Amplituden für jede Korrelationszeit hängen ab von den Winkeln, die das Absorptionsdipolmoment und das Emissionsdipolmoment mit der Symmetrieachse einschließen. Benutzt man die Notation, die in Abbildung 1.12 gezeigt ist, sind diese Amplituden

$$r_1 = 0.3 \sin 2\beta_A \sin 2\beta_E \cos \xi \quad (1.63)$$

$$r_2 = 0.3 \sin^2 \beta_A \sin^2 \beta_E \cos 2\xi \quad (1.64)$$

$$r_3 = 0.1(3 \cos^2 \beta_A - 1)(3 \cos^2 \beta_E - 1). \quad (1.65)$$

Die Fundamentalanisotropie ist gegeben durch

$$r_0 = r_1 + r_2 + r_3 = 0.2(3 \cos^2 \beta - 1). \quad (1.66)$$

Dabei ist β der Winkel zwischen dem Absorptions- und Emissionsdipolmoment und ξ ist der Winkel, den die Projektionen der beiden Dipolmomente in der Ebene senkrecht zur Symmetrieachse einschließen. Die drei Rotationskorrelationszeiten sind durch die zwei Rotationsdiffusionskoeffizienten bestimmt

$$\theta_1 = (D_{\parallel} + 5D_{\perp})^{-1} \quad (1.67)$$

$$\theta_2 = (4D_{\parallel} + 2D_{\perp})^{-1} \quad (1.68)$$

$$\theta_3 = (6D_{\perp})^{-1}. \quad (1.69)$$

D_{\parallel} und D_{\perp} lassen sich für prolate und oblate Ellipsoide berechnen. Sie ergeben sich zu

$$\frac{D_{\parallel}}{D} = \frac{3\rho(\rho - S)}{2(\rho^2 - 1)} \quad (1.70)$$

und

$$\frac{D_{\perp}}{D} = \frac{3\rho[(2\rho^2 - 1)S - \rho]}{2(\rho^4 - 1)}. \quad (1.71)$$

Dabei ist $D = (6\theta_S)^{-1}$ der Rotationsdiffusionskoeffizient einer Kugel mit äquivalentem Volumen und $\rho = a/b$ ist das Verhältnis der Achsenlängen. Der Wert für ρ ist größer als eins für einen prolaten Ellipsoid und kleiner als eins für einen oblaten Ellipsoid. Der Wert von S hängt vom Typ des Ellipsoid ab:

$$S = (\rho^2 - 1)^{-1/2} \ln[\rho + (\rho^2 + 1)^{1/2}] \quad \rho > 1 \quad (1.72)$$

$$S = (1 - \rho^2)^{-1/2} \arctan[(1 - \rho^2)^{1/2}/\rho] \quad \rho < 1 \quad (1.73)$$

Mit diesen Gleichungen wurden die Rotationskorrelationszeiten für einen prolaten Ellipsoid mit den Parametern Molekulgewicht 10000 g/mol, Hydratation 0.2 ml/g, spezifisches Volumen 0.75 ml/g, Viskosität der Lösung 1 cP bei unterschiedlichem Verhältnis der Achsenlängen vorausberechnet. Es ist wichtig zu sehen, daß man nicht direkt die Rotationsdiffusionskoeffizienten mißt, sondern die Rotationskorrelationszeiten, die Funktionen dieser Diffusionskoeffizienten sind. Abbildung 1.13 zeigt, daß die Rotationskorrelationszeiten mit größer werdenden Achsenlängenverhältnissen ansteigen. Bei prolaten Ellipsoiden wachsen zwei der drei Korrelationszeiten (θ_1 und θ_3) mit größer werdendem Achsenverhältnis an, während die dritte Korrelationszeit (θ_2) relativ unabhängig vom Achsenverhältnis ist. Eine der Korrelationszeiten (θ_3) steigt mit wachsendem Achsenverhältnis progressiv an. Die anderen beiden Korrelationszeiten (θ_1 und θ_2) erreichen bei großen Achsenverhältnissen jeweils einen Grenzwert.

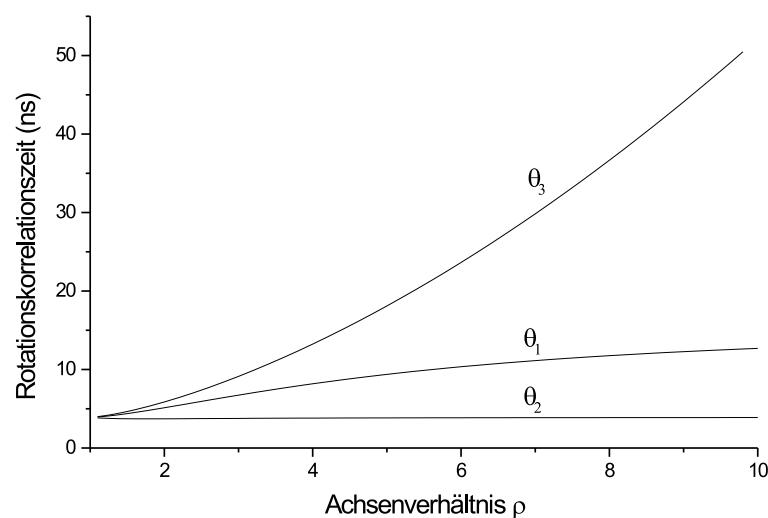


Abbildung 1.13: Rotationskorrelationszeiten für einen prolates Ellipsoid (Molekulgewicht 10000 g/mol, Hydratation 0.2 ml/g, spezifisches Volumen 0.75 ml/g, Viskosität der Lösung 1 cP) bei unterschiedlichen Verhältnissen der Achsenlängen ρ

1.5.18 Besondere Anordnung des Fluorophors innerhalb eines Rotationsellipsoids

Nimmt man an, daß die Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmomente entlang einer Achse eines Rotationsellipsoids ausgerichtet sind, so ergeben sich einfachere Anisotropieabklingverhalten.

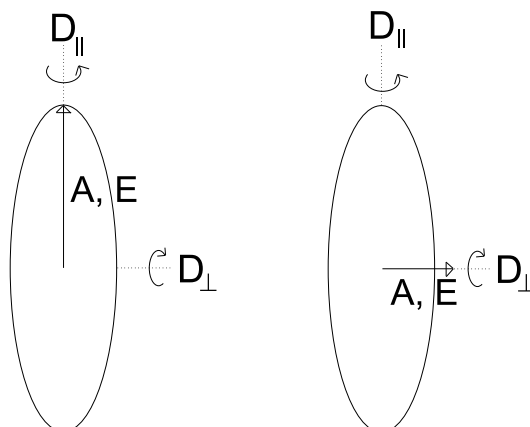


Abbildung 1.14: Ausrichtung des Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoments eines Fluorophors entlang einer Halbachse eines prolates Rotationsellipsoids

Falls beide Übergangsdipolmomente entlang der langen Achse eines prolates Ellipsoids ausgerichtet sind, wie in Abbildung 1.14 auf der linken Seite, sind die Amplituden r_1 und r_2 null und r_3 ergibt sich zu 0.4. Das Anisotropieabklinggesetz ist in diesem Fall

$$r(t) = 0.4 \exp(-6D_{\perp} t) \quad (1.74)$$

mit der Rotationskorrelationszeit $\theta_3 = (6D_{\perp})^{-1}$. Die Rotation der Fluorophorprobe entlang der langen Achse, die durch D_{\parallel} beschrieben wird, verändert nicht die kollinearen Übergangsdipolmomente und erniedrigt somit nicht die Anisotropie. Nur die Rotation, die die Übergangsdipolmomente rotieren läßt (D_{\perp}) ergibt Depolarisation.

Falls die Übergangsdipolmomente senkrecht zur langen Achse des prolaten Ellipsoids ausgerichtet sind, siehe Abbildung 1.14 auf der rechten Seite, ergeben sich zwei Rotationskorrelationszeiten. In diesem Fall ist das Anisotropieabklingverhalten schneller als im ersten Fall, weil die schnellere Rotation entlang der langen Achse nun die Übergangsdipolmomente rotieren läßt. Das Anisotropieabklinggesetz ergibt sich hier zu

$$r(t) = 0.3 \exp(-4D_{\parallel}t - 2D_{\perp}t) + 0.1 \exp(-6D_{\perp}t) \quad (1.75)$$

Die Theorie für die Rotation von Ellipsoiden trifft nur für die „Stick“ Rotationsdiffusion zu. Dies ist Rotationsdiffusion, bei der die ersten Solvenslagen mit dem rotierenden Molekül mitrotieren, so daß die Rotation durch die Viskosität des Lösungsmittels mitbestimmt wird. Makromoleküle in polaren Lösungsmitteln werden gut durch die „Stick“ Diffusion beschrieben.

Kapitel 2

Apparativer Teil

2.1 Der Aufbau der Messapparatur

Den Gesamtaufbau des Meßinstrumentes zeigt schematisch Abbildung 2.1. Das Instrument besteht aus einem isoperibolen Titrationskalorimeter und aus einem FD-Fluorimeter. Der dahinterliegende Gedanke beim Aufbau war, eine Tensidlösung gleichzeitig durch zwei Meßmethoden charakterisieren zu können. Zum einen soll kalorimetrisch das Verhalten von Tensidlösungen in der Nähe des CMC-Bereiches studiert werden wie dies bereits mit einem sehr empfindlichen isothermalen Titrationskalorimeter in den Arbeiten von Blandamer et al. [28] [29] [30] [31] [32] geschehen ist. Das entwickelte Titrationskalorimeter gleicht weitestgehend dem von Wachter beschriebenen Kalorimeter [33]. Es unterscheidet sich vom Wachterschen Kalorimeter lediglich in der Verkleinerung des Meßgefäßes und der Vergrößerung des Thermostatenbades. Die Vergrößerung des Thermostatenbades auf das zweieinhalbfache Volumen wirkt sich in einer Verbesserung der Temperaturkonstanz der Umgebung und damit insgesamt in einer Verbesserung der Temperaturauflösung des Kalorimeters aus. Die Verkleinerung des Meßgefäßes ist vor allem notwendig, um mit kleinen Volumina arbeiten zu können und um die kleinen Wärmetönungen, wie sie beim Verdünnen von Tensidlösungen unter ihre kritische Mizellbildungskonzentration auftreten, schnell und genau detektieren zu können. Wegen der geringeren Empfindlichkeit dieses isoperibolen Titrationskalorimeters verglichen mit isothermalen Titrationskalorimetern sollen Tenside vermessen werden, die hohe CMC-Werte (über 0.01 mol/l) besitzen. Die Arbeiten auf dem Gebiet der Kalorimetrie blieben auf den Aufbau des Meßgeräts, der Bestimmung des ausgestoßenen Volumens der eingesetzten Präzisionsspritzen, sowie der Kalibrierung des als Temperaturfühler eingesetzten Thermistors beschränkt. Eine elektrische bzw. chemische Kalibrierung des Kalorimeters zur Bestimmung seiner Wärmekapazität, sowie Messungen der Verdünnungswärme von konzentrierten Tensidlösungen unterblieben.

Die Mizellen in einer Tensidlösung sollen in ihrer Größe und Gestalt beschrieben werden durch eine fluorimetrische Methode. Dies soll mit Hilfe einer für Mizellen maßgeschneider-ten Fluorophorprobe geschehen, deren Anisotropieabklingverhalten studiert wird. Es soll so eine neue Methode geschaffen werden, die es erlaubt, einfacher, schneller und kostengünstiger als mit Neutronenstreuexperimenten vergleichbare Meßergebnisse zu erzielen. Zunächst soll die Methode an Tensidsystemen erprobt werden, deren Aggregationszahl und Mizellhalbachsen bereits publiziert sind, um Ergebnisse vergleichen zu können.

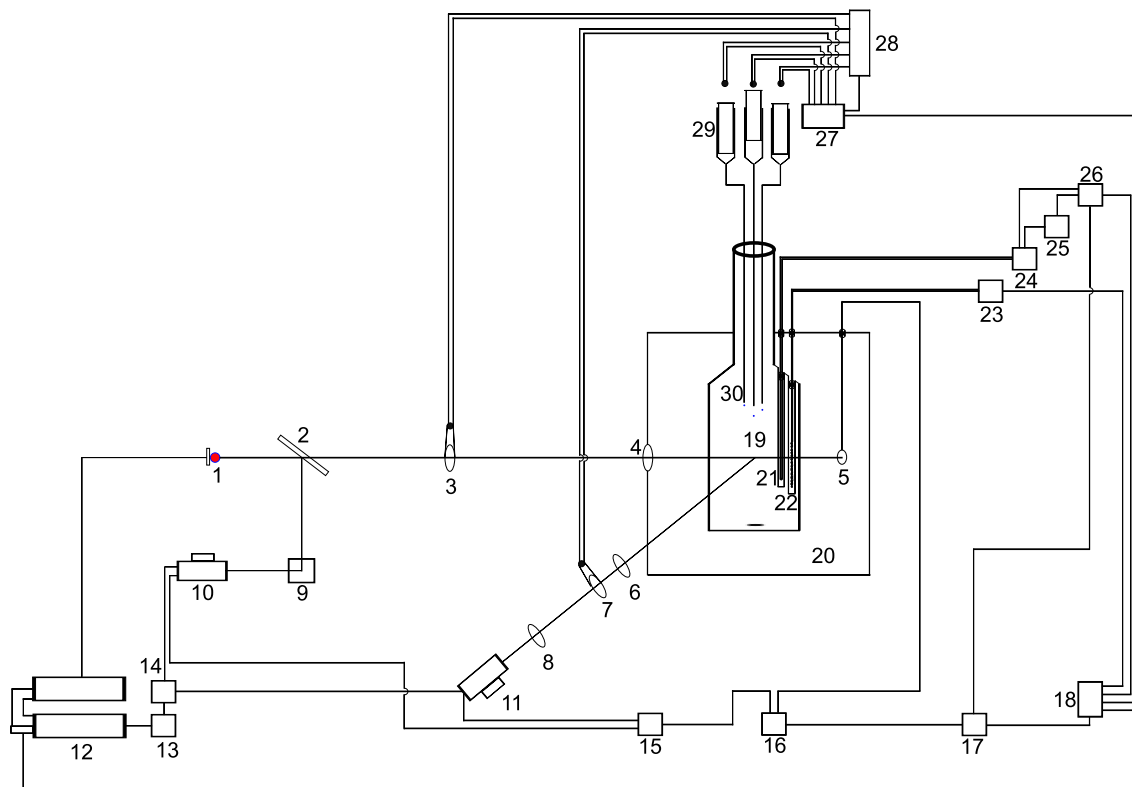


Abbildung 2.1: schematische Skizze der Messapparatur

1 Diodenlaser	11 Photomultiplier	21 Thermistor
2 Strahlteilerspiegel	12 zwei Sinusgeneratoren	22 Kalibrierheizer
3 Polarisationsprisma	13 Verstärker	23 Präzisionsstromquelle
4 Vakuumdichtfenster	14 Power Splitter	24 Wheatstonebrücke
5 Photodiode	15 Verstärker / Filter	25 Spannungsverstärker
6 Interferenzfilter	16 Messkarte	26 AD-Wandler
7 Folienpolarisationsfilter	17 Computer	27 Schrittmotorsteuerung
8 Linse	18 Multiplexer	28 Stromversorgung
9 Fluoreszenzküvette	19 Glasmessgefäß	29 Präzisionspritzen
10 Photomultiplier	20 Vakuumkammer	30 Edelstahlröhrchen

2.2 Das Frequency-Domain Fluorimeter

2.2.1 Sein Aufbau

Die Lichtquelle des Fluorimeters ist ein roter Diodenlaser, der Licht von 655 nm Wellenlänge abstrahlt. Seine Besonderheit ist, daß er modulierbar ist, was bedeutet, daß seine abgestrahlte Lichtintensität zeitlich veränderbar ist durch ein eingespeistes elektrisches hochfrequentes Signal. Auf diese Weise läßt sich die Lichtintensität sinusförmig bis zu 100 MHz modulieren. Das Anregungslicht wird durch einen Strahlteilerspiegel zu ca. 10 % rechtwinklig zum Hauptlichtstrahlengang ausgekoppelt und auf eine Küvette gelenkt, die mit verdünnter Streulösung (kolloidal suspendiertes Silikagel) gefüllt ist. Wiederum rechtwinklig zu diesem Referenzlichtstrahlengang ist ein Photomultiplier angeordnet, der dieses Streulicht detektiert. Das Anregungslicht wird durch ein Glan-Thompson Prisma, das schrittmotorgesteuert drehbar ist, entweder horizontal oder vertikal polarisiert. Danach regt es im Probenraum eine Fluorophorprobe an, die in einer mizellaren Lösung gelöst sich in einem zylinderförmigen Glasgefäß befindet. Das Fluoreszenzlicht wird im rechten Winkel zum Anregungslicht detektiert. Zunächst wird es durch eine Linse, deren Abstand vom Ort der Emission seiner Brennweite entspricht, parallelisiert. Dann passiert es einen Interferenzfilter, der eine Anregungslichttransmission von 10^{-6} aufweist. Ein Folienpolfilter, der sich schrittmotorgesteuert drehen läßt, trennt das Fluoreszenzlicht nach horizontal und vertikal polarisierter Komponente auf, bevor es durch eine zweite Linse auf das Auge des Probenphotomultipliers fokussiert wird. Den fluorimetrischen Teil des Meßinstrumentes zeigt Abbildung 2.2.

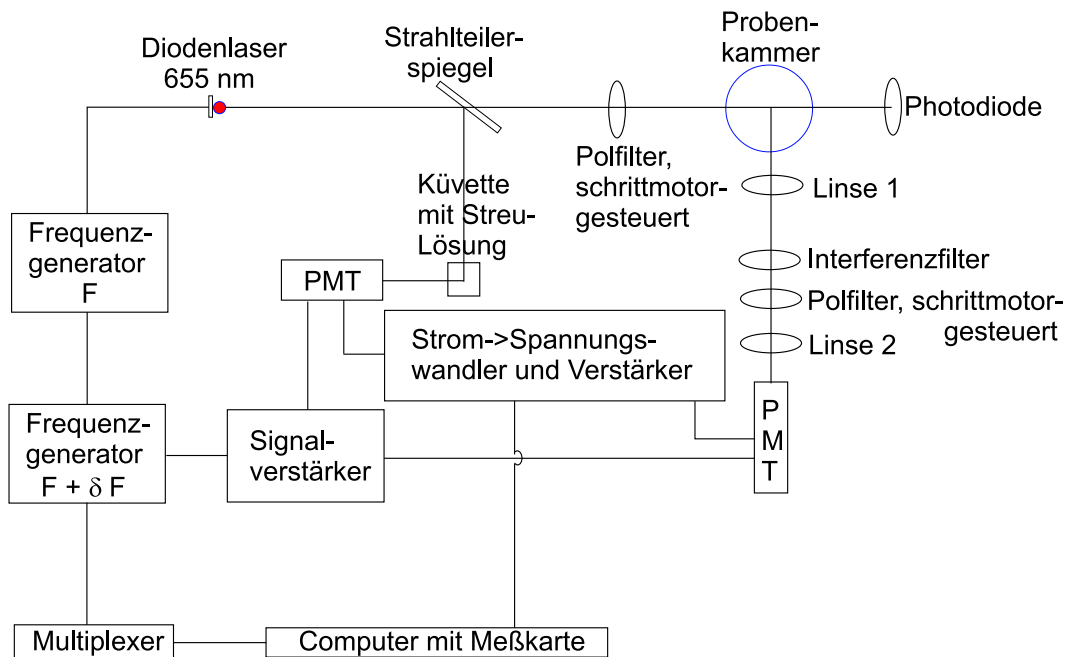


Abbildung 2.2: schematische Skizze des fluorimetrischen Teils der Messapparatur

2.2.2 Das Prinzip der Kreuzkorrelationsdetektion

Kreuzkorrelationsdetektion ist eine grundlegende Eigenschaft von FD-Messungen. Die Idee ist, eine bestimmte Versorgungsspannung der beiden Photomultiplier mit einem Frequenzoffset δF zur Lichtmodulationsfrequenz F zu modulieren. Das Ergebnis ist ein niederfrequentes Signal am Photomultiplierausgang mit der Frequenz δF , die die Phasen- und Amplitudeninformation beinhaltet. Der Phasenshift und die Modulation sind so als ob man sie bei hoher Frequenz beobachtet hätte. Das niederfrequente Signal wird in einer AD-Wandlerkarte digitalisiert und nach Phase und Amplitude ausgewertet. Die Modulation des Lichtes oder der Versorgungsspannung des Photomultipliers braucht kein reines Sinussignal sein, es genügt schon, daß es eine regelmäßig wiederholte Signalfom ist. Nach Kreuzkorrelation beobachtet man ein Signal, das perfekt sinoidal ist.

Dies kann anhand folgender Überlegung nachvollzogen werden. Zunächst wird die Fluorophorprobe mit einem hochfrequenten intensitätsmodulierten Lichtsignal angeregt. Die Fluoreszenzantwort stellt daraufhin ebenfalls eine hochfrequente zeitabhängige Intensität dar:

$$I(t) = I_0[1 + m \cos(\omega t + \phi)] \quad (2.1)$$

Dieses Signal wird mit einem hochfrequenten sinusförmigen Signal $G(t)$, mit der der Detektor moduliert wird, multipliziert:

$$G(t) = G_0[1 + m_c \cos(\omega_c t + \phi_c)] \quad (2.2)$$

G_0 ist dabei der Mittelwert der Funktion, m_c , ω_c und ϕ_c sind die Modulation, die Frequenz und die Phase des Kreuzkorrelationssignals. Multiplikation der Gleichungen 2.1 und 2.2 ergibt nun:

$$S(t) = I_0 G_0 [1 + m \cos(\omega t + \phi) + m_c \cos(\omega_c t + \phi_c) + m m_c \cos(\omega t + \phi) \cdot \cos(\omega_c t + \phi_c)] \quad (2.3)$$

Der letzte Term entspricht

$$\frac{m m_c}{2} [\cos(\Delta\omega t + \Delta\phi) + \cos(\omega_c t + \omega t + \phi + \phi_c)] \quad (2.4)$$

Dabei bedeutet $\Delta\omega = \omega_c - \omega$ und $\Delta\phi = \phi_c - \phi$. Die Frequenzen ω_c und ω unterscheiden sich nur um einen kleinen Betrag, deswegen ist ihre Summe ungefähr gleich 2ω . Daher enthält Gleichung 2.3 einen konstanten Term und Terme mit den Frequenzen ω , ω_c , $\omega + \omega_c \cong 2\omega$ und $\Delta\omega$. Der $\Delta\omega$ Term beinhaltet die Phasen- und Modulationsinformation. Der konstante Term und die Terme mit den Frequenzen ω , ω_c , $\omega + \omega_c \cong 2\omega$ tragen zur mittleren Intensität des gemessenen Signales bei und der Term mit der Frequenz $\Delta\omega$ bestimmt die Phase und Amplitude der niederfrequenten modulierten Emission.

2.2.3 Die beiden Frequenzsynthesizer

Man braucht für kreuzkorrelierte Detektion zwei Frequenzen, die synchronisiert sind, sich aber um eine kleine Differenzfrequenz δF unterscheiden. Die Kreuzkorrelationsfrequenz δF kann beliebige Werte annehmen, sie wird aber meist zwischen 10 und 100 Hz gewählt. Bei diesem beschriebenen Fluorimeter liegt sie bei 40 Hz. Die beiden Frequenzgeneratoren

sollen Frequenzen bis 100 MHz liefern, mit einer Auflösung von 0.1 oder 1 Hz. Benutzt man eine höhere Kreuzkorrelationsfrequenz als 100 Hz, so sind die Anforderungen an die Generatoren niedriger. In der vorliegenden Apparatur ist dies nicht nötig, da die Frequenzgeneratoren nach Literaturstelle [11] von bester Qualität sind. Die Synchronisation der beiden Frequenzen erreicht man dadurch, daß beide Generatoren am selben Frequenzstandard ihre Frequenzen generieren. Diese Anordnung bezeichnet man als phase-locked.

2.2.4 Die beiden Lichtdetektoren

Die Detektoren für FD-Messungen sind Photomultiplier, die modulierbar sind. Photomultiplier bestehen aus einer Photokathode, der sich eine Kette von Dynoden anschließt. Durch diese Anordnung sind Photomultiplier sehr empfindliche Lichtdetektoren. Die Kreuzkorrelation wird dadurch erreicht, daß ein RF-Signal an einer Dynode eingespeist wird. Dabei reichen bereits wenige Volt des eingespeisten Signals aus, um eine fast 100 %ige Modulation des ausgehenden Signals zu erreichen. In diesem Fluorimeter lassen sich die beiden Photomultiplier von 1 bis 400 MHz modulieren.

2.2.5 Digitalisierung des Photomultipliersignals

Photomultiplier sind schwache Stromquellen und um ihr Signal zu digitalisieren, muß zunächst ein Strom-Spannungswandler und ein Spannungsverstärker vor die Meßkarte geschaltet werden. Dieses Signal wird durch ein einfaches low-pass Filter gefiltert. Die beiden niederfrequenten Spannungssignale aus Proben- und Referenzphotomultiplier werden nun an zwei Eingänge einer 16 bit Analog-Digitalwandlerkarte gelegt. Dort werden sie mit einer Abtastrate von 4kByte/s digitalisiert. Dabei werden die Signale in beiden Kanälen abwechselnd digitalisiert und der Zeitpunkt jedes einzelnen Meßwertes festgehalten. So kann der Zeit-Spannungsverlauf der beiden Sinussignale gleichzeitig nebeneinander gemessen werden.

2.2.6 Charakterisierung der digitalisierten Sinussignale

Um für eine Einzelmessung (Anfangs-)Phase, Amplitude und Offset für beide Sinussignale zu erhalten, werden je 1000 Meßwerte und ihr genauer Meßzeitpunkt bestimmt. Mit Hilfe einer Schätzroutine werden Startwerte für einen Levenberg-Marquardt Algorithmus bestimmt, welcher dann die gewünschten Phasen-, Amplituden-, und Offsetwerte liefert. Wird eine vorgegebene maximale Iterationsschrittzahl für diesen Algorithmus überschritten, so wird das Ergebnis verworfen. Auf diese Weise wird bei 100 Einzelmessungen die Standardabweichung der Phasendifferenz zwischen parallel gemessenen Proben- und Referenzsinussignalen typischerweise kleiner als 0.2° und die ihrer Amplituden kleiner 0.5 %.

2.2.7 Die Gesamtmessung

Eine Gesamtmessung umfaßt je 100 Einzelmessungen bei horizontaler und vertikaler Emissionspolfilterstellung für 20 logarithmisch äquidistante Meßfrequenzen im Bereich von 3

bis 31 MHz. Dies entspricht 4000 Einzelmessungen. Eine solche Messung dauert ca. 1 Stunde. Zunächst werden die Mittelwerte von Phasendifferenz und Amplitude bei horizontaler und bei vertikaler Polfilterstellung und ihre Standardabweichungen bestimmt. Aus diesen Meßwerten wird die Modulation und die Phase ermittelt. Die Modulation ergibt sich aus dem Verhältnis des Mittelwerts der Amplitude bei vertikaler Polfilterstellung zum Mittelwert der Amplitude bei horizontaler Stellung. Die Phase ermittelt sich aus der Differenz zwischen der mittleren Phasendifferenz bei horizontaler Polfilterstellung und der mittleren Phasendifferenz bei vertikaler Stellung. Die entsprechenden Standardabweichungen der Modulation und der Phase werden nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ermittelt. Als Ergebnis einer Messung erhält man eine Tabelle, in deren erste Spalte die Meßfrequenz in MHz eingetragen ist, in die zweite Spalte die Phase in Grad, die dritte die Modulation und in die vierte und fünfte die jeweiligen Standardabweichungen.

2.2.8 Die Auswertung der Meßdaten

In einem Auswerteprogramm mit dem Namen DIFANL wird diese Tabelle eingelesen. Zunächst wird man gefragt, mit wieviel Rotationskorrelationszeiten man die Meßdaten auswerten möchte. Man gibt zusätzlich die Parameter Abklingdauer, Fundamentalanisotropie und Schätzwerte für die Rotationskorrelationszeiten mit ihrer Gewichtung vor und hat die Möglichkeit, diese Parameter wahlweise frei gleiten oder festhalten zu lassen. Als Ergebnis erhält man einen Fit dieser Parameter unter Angabe einer Größe, die die Güte des Fits beschreibt. Neben der Angabe der gefitteten Parameter erhält man einen graphischen Ausdruck, der die Abweichungen der einzelnen Meßpunkte von einer Fitkurve angibt.

2.2.9 Justierung des Fluorimeters

2.2.9.1 Justierung der Polfilter

Für genaue Messungen der Fluoreszenzanisotropie ist es erforderlich, daß die Polfilter genau in der vertikalen oder horizontalen Position ausgerichtet sind. Die genaue horizontale bzw. vertikale Ausrichtung beider Polfilter kann mit Hilfe einer verdünnten kolloidalen Silikagellösung vorgenommen werden. Da Streulicht zu 100 % polarisiert ist, würde sich ein Anisotropiewert von $r = 1.00$ ergeben. Üblicherweise wird davon ausgegangen, daß die Justierung in Ordnung ist, falls sich ein Wert von $r \geq 0.97$ ergibt. Die Justierung wird so vorgenommen, daß zunächst der Anregungspolfilter vertikal ausgerichtet wird. Dann wird der Emissionspolfilter so ausgerichtet, daß minimale Intensität gemessen wird. Das ist dann seine horizontale Ausrichtung. Die maximale Intensität bei vertikaler Ausrichtung ist weniger scharf definiert. Rotation des Emissionspolfilters ergibt nun maximale bzw. minimale Intensität bei vertikaler bzw. horizontaler Ausrichtung. Justierung des Anregungspolfilters geschieht nun auf ähnliche Weise. Der Emissionspolfilter wird in die vertikale Position gedreht. Maximale bzw. minimale Intensität wird beobachtet, falls der Anregungspolfilter in die vertikale bzw. horizontale Position gedreht wird.

2.2.9.2 Bestimmung des G-Faktors

Der G-Faktor, der auch Geometriefaktor heißt, errechnet sich aus den unterschiedlichen Durchlässigkeiten des Fluorimeters für horizontal und vertikal polarisiertes Emissionslicht. Um diesen Faktor zu bestimmen, füllt man eine ethanolische Lösung von Kresylviolett Perchlorat in das Messgefäß. Die Abklingdauer dieses Fluorophors ist mit 3.23 ns wesentlich länger als seine Rotationskorrelationszeit von 280 ps. Damit emittiert dieser Fluorophor unpolarisiertes Licht. Zunächst wird der Anregungspolfilter in die horizontale Position gefahren und dann der Emissionspolfilter einmal in die vertikale und einmal in die horizontale Position gefahren. Das Verhältnis der gemessenen Lichtintensitäten bei den beiden Positionen ist der G-Faktor. Nimmt man an, $G = 2.0$, so bedeutet dies, daß bei unpolarisiertem Emissionslicht der Probe vertikal polarisiertes Licht mit der doppelten Intensität des horizontal polarisierten Lichtes am Photomultiplier ankommt. Da aber im Emissionslichtgang mit einem Filter zur Abtrennung des Anregungslichtes gearbeitet wird und Filter generell keinen Einfluß auf die vertikale und horizontale Komponenten des Emissionslichtes haben, erwartet man einen Wert von 1.0 für G, der auch gemessen wurde. Dieser Faktor soll explizit bestimmt werden, da möglicherweise durch Drehung des Emissionspolfilters das fokussierte Bild der Fluoreszenz seine Position ändern könnte, und sich damit ein Einfluß auf die effektiven Durchlässigkeiten ergibt.

2.2.10 Messungen von Fluoreszenzanisotropien nach der L-Format oder Einkanalmethode

L-Format bedeutet, das das Fluorimeter nur einen Emissionsgang hat, der rechtwinklig zum Anregungsgang angeordnet ist. Zunächst nimmt man an, daß die Probe mit vertikal polarisiertem Licht angeregt wird. Möglicherweise hat das Fluorimeter eine unterschiedliche Durchlässigkeit für vertikal und horizontal polarisiertes Licht, die durch optische Komponenten im Emissionslichtgang (Filter, Linse oder Monochromator) hervorgerufen werden. Das bedeutet, daß durch Drehen des Emissionspolfilters sich die gemessenen Intensitäten verändern, wenn die Probe unpolarisiertes Licht emittiert. Die gemessenen Intensitäten sind dann nicht mehr die gewünschten parallelen und senkrechten Intensitäten (siehe Abbildung 2.3).

Das Ziel ist nun, die ursprünglichen Intensitäten I_{\perp} und I_{\parallel} zu messen, die nicht durch das Detektionssystem verändert wurden. Im folgenden benutzt man zwei Buchstaben H und V, um anzudeuten, wie die Anregungspolfilter und Emissionspolfilter orientiert sind. Zum Beispiel bedeutet I_{HV} , daß der Anregungspolfilter horizontal und der Emissionspolfilter vertikal ausgerichtet ist. Die Anordnung der Buchstaben zeigt also an, in welcher Reihenfolge das Licht durch die beiden Polfilter durchläuft. S_V und S_H seien nun die Durchlässigkeiten des Emissionskanals für vertikal und horizontal polarisiertes Emissionslicht. Damit sind für vertikal polarisierte Anregung die beobachteten Intensitäten

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad (2.5)$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp}. \quad (2.6)$$

k ist dabei ein Proportionalitätsfaktor, in den z.B. die Quantenausbeute des Fluorophors und andere instrumentelle Einflußgrößen eingehen. Teilt man Gleichung (2.6) durch (2.5)

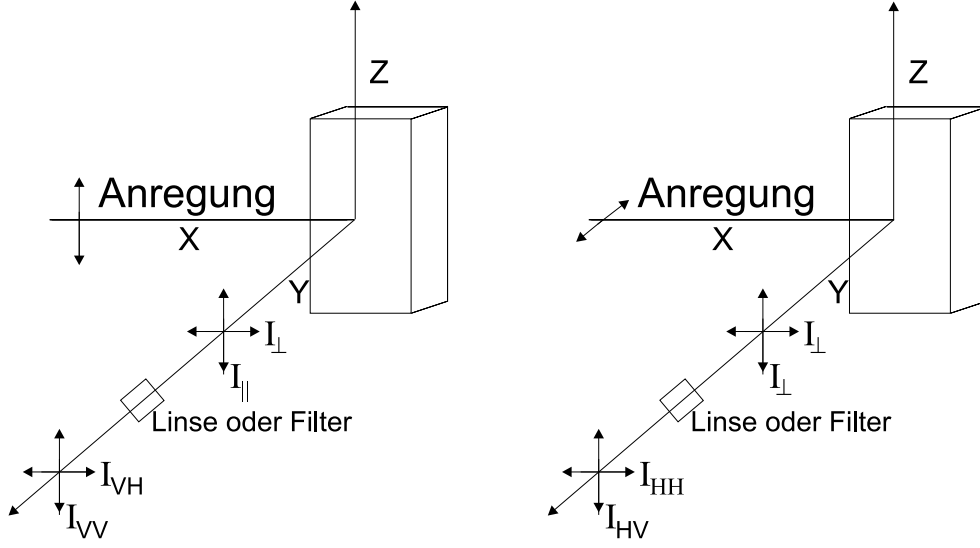


Abbildung 2.3: Bestimmung des G-Faktors nach der Einkanalmethode

ergibt sich

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{||}}{I_{\perp}} = G \frac{I_{||}}{I_{\perp}}. \quad (2.7)$$

Um das gewünschte Intensitätsverhältnis ($I_{||}/I_{\perp}$) zu errechnen, muß also erst ein G-Faktor bestimmt werden, der das Verhältnis der Durchlässigkeiten des Detektionssystems für vertikal und horizontal polarisiertes Emissionslicht angibt.

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (2.8)$$

Der G-Faktor kann mit horizontal polarisiertem Anregungslicht bestimmt werden. Unter dieser Bedingung sind die beiden horizontal und vertikal polarisierten Komponenten der Emission gleich und proportional zu I_{\perp} . Das liegt daran, daß beide Emissionspolfilterstellungen senkrecht zum polarisierten Anregungslicht stehen. Daher müssen gemessene Unterschiede der polarisierten Komponenten der Emission auf die unterschiedlichen Durchlässigkeiten für diese Komponenten zurückzuführen sein. Es gilt also

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\perp}}{I_{\perp}} = \frac{S_V}{S_H} = G. \quad (2.9)$$

Wenn der G-Faktor bekannt ist, kann das Verhältnis $I_{||}/I_{\perp}$ errechnet werden.

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{1}{G} = \frac{I_{||}}{I_{\perp}} \quad (2.10)$$

Die Anisotropie errechnet sich dann nach

$$r = \frac{(I_{||}/I_{\perp}) - 1}{(I_{||}/I_{\perp}) + 2} = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} = \frac{\frac{I_{VV}}{I_{VH}} - G}{\frac{I_{VV}}{I_{VH}} + 2 \cdot G} \quad (2.11)$$

2.2.11 Messungen der Rotationskorrelationszeit des Porphyrinmoleküls in einer Mizelle

Das komplette Fluorimeter wird zwei Stunden vor der Messung eingeschaltet. Dabei müssen den beiden Frequenzsynthesizern feste Frequenzwerte vorgegeben werden. Der Optikeinsatz in der Vakuumkammer des Fluorimeters, der die Emissionssammellinse aufnimmt, muß auf seine korrekte Stellung überprüft werden. Das Meßgefäß soll ebenfalls mindestens 10 Minuten vor der Messung mit der zu messenden Lösung befüllt werden und der komplette Einsatz am Deckel des Thermostatenbeckens verschraubt werden. Einzelne Testmessungen sollen bei der größten zu erwartenden Sinusamplitude der Emission, also bei der niedrigsten Meßfrequenz und vertikaler Stellung des Emissionspolfilters einen Korrelationskoeffizienten zu einem Sinus von größer 0.7 ergeben. Dies ist notwendig, damit ein Limit der Fitroutine nicht unterschritten wird. Die Messung selbst erfolgt durch sequentielles Anlegen von 20 logarithmisch äquidistanten Meßfrequenzen zwischen 3 und 31 MHz durch die Signalgeneratoren, wobei bei jeder Frequenz das Fluoreszenzsignal einmal durch eine horizontale und anschließend eine vertikale Polfilterstellung beobachtet wird. Man berechnet bei jeder Frequenz die Phasendifferenz der beiden Signale sowie ihr Amplitudenverhältnis, welches man auch als Modulation bezeichnet. Zu jeder Meßfrequenz ermittelt man nun diese beiden Meßwerte, sowie ihre Standardabweichungen und übergibt sie formatiert an eine weitere Fitroutine. Diese bestimmt nun aus den Messdaten und mittels bereits gemessener Abklingzeiten und Fundamentalanisotropie des Fluorophors die wahrscheinlichsten Werte für die Rotationskorrelationszeit des Fluorophors in einer Mizelle.

2.3 Das isoperibole Titrationskalorimeter

2.3.1 Überlegungen beim Aufbau des Titrationskalorimeters

nach “Chapter 9: Instrumentation in Titration Calorimetry in: Thermometric Titrations“ [33]

Das charakteristische Merkmal eines isoperibolen Kalorimeters ist die konstante Umgebungstemperatur θ , die sich von der sich ändernden Temperatur T des Kalorimetergefäßes unterscheidet. Das Kalorimetergefäß soll so gut wie möglich thermisch vom Thermostatenbad isoliert sein. Dies erreicht man durch Anlegen eines Vakuums von 10^{-3} mbar im unteren Kalorimeterbehälter. Die Gleichgewichtszeit, also die Zeitdauer, bis sich ein Temperaturgleichgewichtszustand im Kalorimetergefäß ausbildet, sollte im Bereich von wenigen Sekunden liegen.

Das Kalorimetergefäß und sein Inhalt tauschen kontinuierlich Wärme und Stoffmenge mit der Umgebung aus. Ein unkontrollierter Austausch von Materie kann durch Verdampfungsverlust auftreten und kann durch sorgfältige Konstruktion des Kalorimeters eingedämmt werden. Der Wärmeaustausch zwischen dem Kalorimetergefäß mit Inhalt und seiner Umgebung wird durch das Newtonsche Abkühlungsgesetz $W_A = -\kappa C(T - \theta)$ mitberücksichtigt. Um diesen Wärmeaustausch klein zu halten, muß eine kleine Abkühlungskonstante κ und eine kleine Temperaturdifferenz $(T - \theta)$ angestrebt werden. Die Abkühlungskonstante κ setzt sich additiv aus Beiträgen des Wärmeaustausches durch Strahlung, Wärmeleitung und -konvektion zusammen. Bei einem Temperaturunterschied von einem Kelvin zwischen Thermostatenbad und Kalorimeterinnengefäß bei einer mittleren Temperatur ergibt sich ein Fehler in der Abkühlungsleistung durch Strahlung von weniger als 0.01 %; der Wärmeaustausch durch Strahlung darf also vernachlässigt werden. Der Wärmeaustausch durch Wärmeleitung kann am besten durch Anlegen eines Vakuums zwischen Gefäß und Kalorimeterinnenraum verhindert werden. Auf diese Weise wird der Wärmeabfluß durch den Glashals größer als der, der über den gasförmigen Übertrag stattfindet. Es ist vor allem die Luftkonvektion, die bei 10^{-3} Torr sprunghaft aufhört. Bei Drücken von 10^{-3} mbar ist die Wärmeleitung durch die Gasphase vernachlässigbar klein (siehe Dissertation Riederer 1981, S 39).

2.3.2 Die Temperaturmessungen

Die wichtigsten Eigenschaften, die von einem Temperatursensor erwartet werden, sind hohe Empfindlichkeit, um kleine Temperaturänderungen detektieren zu können, Langzeitstabilität und eine schnelle Antwort auf Temperaturveränderungen. Weitere wichtige Eigenschaften sind Größe und nötiges Instrumentarium für dessen Betrieb. Thermistoren erfüllen diese Erwartungen in idealer Weise. Thermistoren sind kleine Halbleiterelemente, die über einen großen Widerstandsbereich erhältlich sind und die einen großen negativen Temperaturkoeffizienten haben. Durch den geringen Strom, der während einer Messung durch sie fließt, haben sie nur eine sehr kleine Eigenaufheizung. So kann man sehr kleine Temperaturänderungen mit Hilfe einer Wheatstoneschen Brücke, in der ein hochohmiger Thermistor (ca 10 k Ω bei 25°C) in den Meßzweig eingebunden ist, messen. Die gemessene Brückenspannung läßt sich linearisieren, indem ein Festwiderstand parallel zum Thermistor in den Meßzweig geschaltet wird. Der Widerstand des Thermostatenbad- und

Kalorimetergefäßthermistors wird nun in regelmäßigen zeitlichen Abständen bestimmt. Im Meßweig kann jeweils ein Thermistor gesteuert eingebunden werden. Die sich ergebende Brückenspannung wird über einen Spannungsverstärker verstärkt, mittels eines AD-Wandlers digitalisiert und über eine serielle Schnittstelle ausgelesen. Diese Meßvorrichtung ist in Abbildung 2.4 veranschaulicht. Die ausgelesenen Widerstandswerte der Thermistoren wurden mit der Temperaturanzeige eines geeichten Temperaturmeßgeräts $\Lambda\Sigma\Lambda$ Typ F250 verglichen.

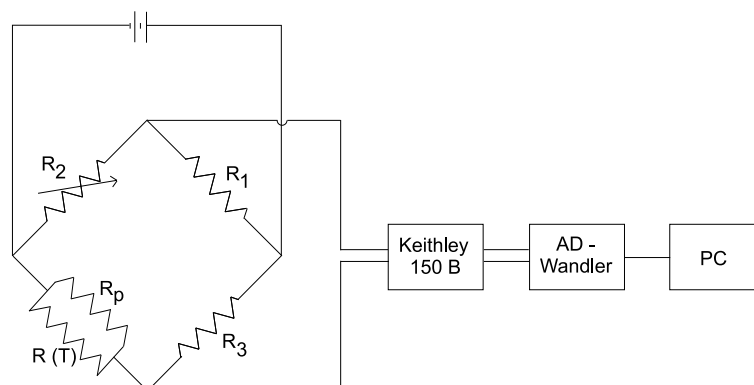


Abbildung 2.4: Skizze des Temperaturmessvorrichtung

Bei einem fest eingestellten Arbeitswiderstand R_2 an der Wheatstoneschen Brücke und bei einer konstanten Verstärkung der Brückenspannung ergibt sich bei beiden Thermistoren in einem Temperaturintervall von 24.50 bis 26.00°C ein linearer Zusammenhang zwischen Temperaturanzeige des $\Lambda\Sigma\Lambda$ Meßgeräts und dem Widerstandswert des zum Meßfühler des $\Lambda\Sigma\Lambda$ Meßgeräts benachbarten Thermistors. Eine hohe Temperaturauflösung wird mit Hilfe eines Spannungsverstärkers sichergestellt, der die Brückenspannung genügend verstärkt einem AD-Wandler zuführt. Die kleinste messbare Temperaturauflösung beträgt 0.3 Millikelvin.

2.3.3 Der kalorimetrische Teil der Messapparatur

Den kalorimetrischen Teil der Meßapparatur zeigt Abbildung 2.5. Das Thermostatenbecken mit 120 Liter Wassereinhalt wird durch eine Temperaturregelung bei 25.000°C Solltemperatur gehalten. Die Fluktuationen im Kurzzeitbereich liegen bei ± 0.8 mK, und im Langzeitbereich bei ± 1.5 mK. Das Temperaturregelsystem des Beckens besteht aus einem Wärmetauscher, der an den Hauswasserkühlkreislauf angeschlossen ist und einer Heizschlange. Die Heizung wird durch ein PID Steuergerät mit Leistungsteil geregelt, das wiederum durch einen Thermistor als Temperatursensor gesteuert wird. Das zylindrische Kalorimetergefäß (kg) mit ca. 20 ml Inhalt besteht aus Duranglas. Der Kalorimeterbehälter, der im Deckel des Thermostatenbeckens eingefast ist, besteht aus zwei Teilen: der untere Teil (ukb), in dem Ölpumpenvakuum angelegt werden kann, ist aus Edelstahl, der obere (okb) aus Messing. Der Hals des Kalorimetergefäßes (kg) wird mit einem Ring aus Perbunan und einer Verschraubung (v) am Deckel (d) des unteren Kalorimeterbehälters (ukb) luftdicht befestigt. Zusätzlich ist das Kalorimetergefäß auf Höhe der Verschraubung mit dem Deckel verklebt und damit in seiner Position fixiert. Das Kalorimetergefäß besitzt zwei gläserne, mit Apiezon M Fett gefüllte und am Eingang verschlossene Schutzröhrchen, die

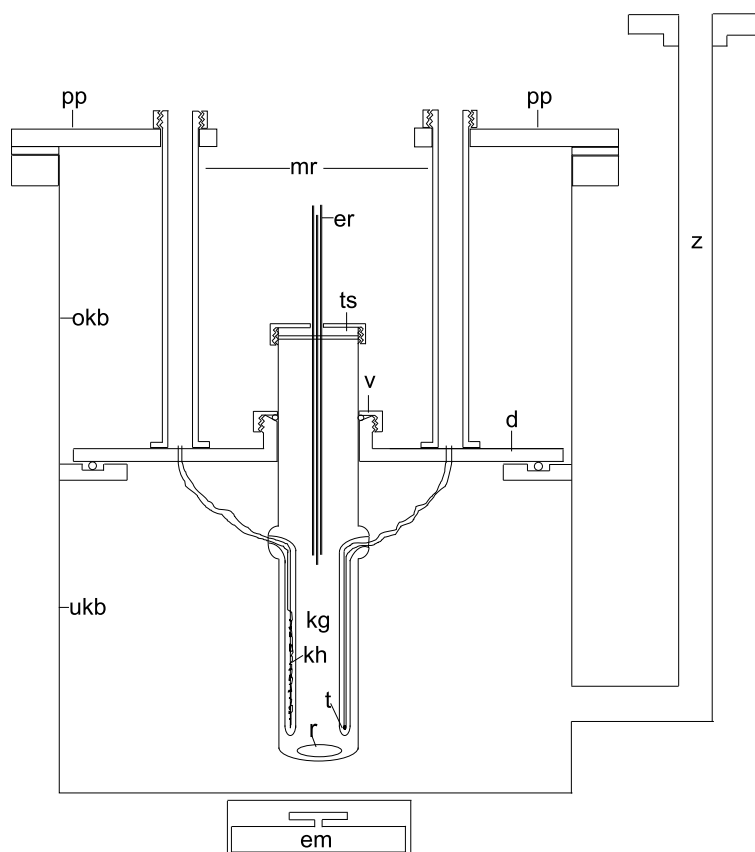


Abbildung 2.5: Skizze des Titrationskalorimeters

von oben in die Meßlösung eintauchen. Das Fett dient zur besseren Wärmeübertragung. In dem einen Röhrchen ist ein Kalibrierheizer (kh) und in dem anderen ein Thermistor (t) untergebracht. Ein Rührfischchen (r) im Kalorimetergefäß wird durch einen Elektromotor (em), der sich unterhalb des Kalorimeterbehälters befindet, angetrieben. Drei Edelstahlröhrchen (er), durch die die Titranden zugeführt werden, sind durch eine Teflonscheibe (ts) und eine Verschraubung am oberen Ende des Kalorimetergefäßes fixiert. Der Deckel (d) des unteren Kalorimeterbehälters, an dem das Kalorimetergefäß befestigt ist, wird mit Hilfe eines O-Rings luftdicht an den unteren Kalorimeterbehälter angeflanscht. Die Zuleitungen zum Heizer und Thermistor führen luftdicht durch den Deckel und werden oberhalb des Deckels über Messingröhren (mr) nach außen zur Präzisionsstromquelle und zur Wheatstoneschen Brücke geleitet. Die Messingröhren sind unten mit dem Deckel und oben mit einer Plexiglasplatte (pp) verbunden. Die Plexiglasplatte wird am Deckel des Thermostatenbeckens angeschraubt. Dadurch wird der Einsatz, bestehend aus Plexiglasplatte, Messingröhren, Deckel und Kalorimetergefäß im Kalorimeterbehälter befestigt und ein vakuumdichter Abschluß des unteren Kalorimeterbehälters sichergestellt. Das Vakuum kann über eine Zuleitung (z) durch eine Rotationsdiffusionspumpe angelegt werden. Alle zugeführten Lösungen werden aus thermostatisierten Titrandvorratsflaschen angesaugt und gelangen über Teflonkapillarschläuche und 2 Meter lange Edelstahlröhrchen in das Messgefäß. Die Röhrchen verlaufen im Thermostatenbecken und dienen dem Temperaturangleich der Titranden an die Thermostatenbadtemperatur.

2.3.4 Bestimmung des ausgestoßenen Volumens der Präzisionsspritzen

Die Zugabe von Titrandlösungen erfolgt durch drei Präzisionsspritzen, die über umgepumptes Thermostatenbeckenwasser thermostatisiert werden. Deren Stempel wird mittels Spindelhubantrieb von Schrittmotoren hoch- und niedergefahren. Um die Zugabe zu kalibrieren, wurde für jede Spritze bei einer konstanten Drehzahl der Schrittmotore von hundert Schritten pro Minute mehrmals die Masse an ausgestoßenem Wasser ausgewogen. Über die Dichte von Wasser wurde das ausgestoßene Volumen pro Schritt bestimmt.

Spritze	Volumen / Schritt	σ (Volumen / Schritt)
1	80.4803 nl	0.1866 nl
2	80.8601 nl	0.1225 nl
3	35.6970 nl	0.0448 nl

Tabelle 2.1: Bestimmung des ausgestoßenen Volumens der drei Präzisionsspritzen

2.3.5 Elektrisches und Chemisches Kalibrieren des Titrationskalorimeters

2.3.5.1 Elektrische Kalibrierung

Die elektrische Kalibrierung des Kalorimeters erfolgt durch Zuführen einer definierten Wärmemenge über den Kalibrierheizer in das Kalorimetergefäß, in dem sich eine bekannte Masse an Wasser befindet. Auf diese Weise läßt sich bei bekannter Wärmekapazität des Wasserinhaltes die Wärmekapazität des Gefäßes ermitteln. Der Heizstrom und die Heizdauer lassen sich über eine programmierbare Präzisionsstromquelle einstellen. Zunächst wird eine Vorperiode von 10 Minuten Länge aufgezeichnet, dann wird ein konstanter Heizstrom zugeführt und schließlich eine Nachperiode von weiteren 10 Minuten aufgezeichnet. Man verwendet als Heizdraht einen Widerstandsdraht mit einem kleinen Temperaturkoeffizienten. Die zugeführte Energie berechnet sich nach

$$\Delta E_{\text{elektr.}} = RI^2 \Delta t \quad (2.12)$$

Der Widerstand des Heizdrahtes wurde zu $16.246 \, \Omega$ bestimmt. Die resultierende Wärmekapazität $C_0(m)$ des Systems für die jeweilige Wassermasse ergibt sich zu

$$C_0(m) = \frac{E_{\text{elektr.}}}{\Delta T} \quad (2.13)$$

2.3.5.2 Chemische Kalibrierung

Zur chemischen Kalibrierung benutzt man die Reaktion einer Lösung von 5 g/l Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (THAM) mit einer 0.1 molaren Salzsäurelösung [34]. Die THAM-Lösung bereitet man folgendermaßen: man mörsert THAM, erhitzt es, läßt langsam abkühlen, mörsert und erhitzt es nochmals und läßt wiederum langsam abkühlen, danach legt man ein Ölpumpenvakuum an und entfernt dadurch eventuell anhaftende Lösungsmittelreste. Man löst 5.00 g von diesem THAM in 1.00 Liter Wasser.

Die Lösungsenthalpie in 0.1 mol/l HCl bei einer Konzentration von 5 g/l von amorphem THAM beträgt nach NIST (-29770 ± 32) J/mol.

Falls sowohl elektrische als auch chemische Kalibrierung innerhalb ihrer Fehlergrenzen übereinstimmen, lassen sich systematische Fehler ausschließen.

2.4 Bedienung des Steuerprogrammes Flu_kal1

Nach Starten des Programmes lassen sich 7 Untermenüs auswählen: Messkarte, Frequenzsynthesizer, Stromquelle, Optik, Spritzen, Kalorimetrie und Messung. Zugehörig zu diesem Programm sind eine Methodendatei, in der eine bestimmte Meßmethode festgelegt wird, sowie eine Konfigurationsdatei, in der gerätespezifische Eintragungen abgespeichert sind. Beide Dateien sind editierbar und werden vom Hauptprogramm Flu_kal1 bei dessen Start eingelesen. Für das Steuern und Auswerten des fluorimetrischen Teil der Meßapparatur sind die Menüpunkte Messkarte, Frequenzsynthesizer, Optik und Messung geschaffen worden, für den kalorimetrischen Teil die Menüpunkte Stromquelle, Spritzen und Kalorimetrie.

2.4.1 Der Menüpunkt Frequenzsynthesizer

Im Menü Frequenzsynthesizer befinden sich folgende Statusinformationen aus der Konfigurationsdatei: der Multiplexer hängt am PC-Port Com 1 und die beiden Frequenzsynthesizer werden vom Multiplexerport Nr. 1 aus gesteuert. In diesem Menü lassen sich die beiden Synthesizer durch 20 Knöpfe zum Einstellen einer Meßfrequenz, 10 Knöpfe zum Einstellen einer Sinusamplitude und 4 Knöpfe zum Abfragen der aktuellen Frequenz und Amplitude steuern. Das Programm steuert die beiden Synthesizer so, daß der erste die eingestellte Meßfrequenz und der zweite die um die Beatfrequenz von 40 Hz erhöhte Meßfrequenz liefert. In der aktuellen Methoden-Datei sind 20 Meßfrequenzen logarithmisch äquidistant zwischen 3 und 31 MHz festgelegt.

2.4.2 Der Menüpunkt Optik

Im Menü Optik befinden sich folgende Statusinformationen aus der Konfigurationsdatei: der Multiplexer hängt am PC-Port Com 1 und die Polfilterschrittmotore werden über den Multiplexerport Nr. 3 gesteuert. Ferner ist die Anzahl der Schritte pro Minute, die die beiden Polfilterschrittmotore ausführen, festgelegt. Hier sind auch die Anzahl der Schritte für horizontale und vertikale Ausrichtung der Polfilter im Anregungs- und Emissionsstrahlengang einsehbar. Für den Polfilterschrittmotor im Anregungsstrahlengang ergeben sich

3 mögliche Positionen, die er anfahren kann: eine Endposition, die durch einen Permanentmagneten, der über eine ortsfest platzierte Hall-Sonde streicht, festgelegt ist, sowie eine horizontale und eine vertikale Polfilterstellung. Für den Schrittmotor im Emissionsstrahlengang kann eine zusätzliche Position angefahren werden, nämlich die magic angle Position, die 54.7° aus der Vertikalen ausgelenkt ist. Für alle Polfilterpositionen gilt, daß erst die Endposition angefahren werden muß, bevor eine horizontale oder vertikale Position neu eingenommen werden kann. Darüber hinaus gibt es 3 Stop-Knöpfe zum sofortigen Stop einzelner oder aller Polfilterschrittmotore. Für eine Messung muß der Polfilterschrittmotor im Anregungsstrahlengang in die vertikale Position gefahren werden.

2.4.3 Der Menüpunkt Messkarte

Im Menüpunkt Messkarte kann für Testzwecke eine Einzelmessung mit je 1000 Meßpunkten aus 2 Kanälen durchgeführt werden. In diese beiden Kanäle werden die Ausgänge von Proben- und Referenzphotomultiplier eingespeist. Durch Drücken des Fitten-Knopfes werden zwei Sinuskurven an die jeweils 1000 Meßpunkte angefittet und zwei Korrelationskoeffizienten, zwei Amplituden und Offsets sowie der Phasenunterschied in Grad angegeben. Zunächst ist über den Zieldatei-Knopf eine Zieldatei anzugeben, in der die Meßergebnisse abgespeichert werden sollen. Durch Drücken eines Schiebeknopfes werden 100 dieser Einzelmessungen gemacht. Nachdem diese 100 Messungen durchgeführt worden sind, öffnet sich durch Drücken des ShowFitResults-Knopfes ein Fenster mit der Bezeichnung gefittete Sinusergebnisse, das die Ergebnisse jeder Einzelmessung sowie die Mittelwerte von Phasendifferenz, Amplitude, Standardabweichung der Phasendifferenz und der Amplitude enthält. Durch Anklicken dieses Fensters sind die Ergebnisse der zuletzt erfolgten Messung einsehbar. Dieses Fenster enthält auch einen Knopf Statistik → Auswertung, der die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen in eine Meßtabelle im Untermenü Messung übernimmt. Für jede der 20 Meßfrequenzen werden nun nacheinander Meßwerte für horizontale und vertikale Emissionspolfilterstellung ermittelt und in diese Meßtabelle eingetragen.

2.4.4 Der Menüpunkt Messung

Im Menüpunkt Messung werden mit Hilfe der eben beschriebenen Meßtabelle Phasendifferenz, Amplitudenverhältnis und ihre Standardabweichungen zwischen horizontaler und vertikaler Polfilterstellung bei jeder Meßfrequenz automatisch bestimmt. Ein Knopf „Starte externe Auswertung“ startet dann einen Editor, in dem alle Meßergebnisse nach Meßfrequenzen geordnet aufgeführt werden. Die entsprechende Datei läßt sich dann mit dem CFS-Shell Programm und dem Unterprogramm DIFANL auswerten, um die wahrscheinlichsten Werte für Abklingdauer, Rotationskorrelationszeiten und Anisotropien zu bestimmen.

2.4.5 Der Menüpunkt Stromquelle

Im Menüpunkt Stromquelle gibt man die Wärmemenge, die dem Kalorimeterinnengefäß über den Kalibrierheizer zugeführt werden soll und den Strom vor. Das Programm berechnet die Aufheizdauer und nach Drücken des Knopfes Aufheizen wird die entsprechende Wärmemenge zugeführt.

2.4.6 Der Menüpunkt Spritzen

Im Menüpunkt Spritzen sind Statusinformationen einsehbar, die den PC-Port, an dem der Multiplexer hängt, sowie den Multiplexerport angeben, über den die Spritzenschrittmotore gesteuert werden. Ebenso sind hier die maximale Anzahl von Schritten pro Minute der Spritzenschrittmotore festgelegt, wie auch das Totvolumen in den Kapillarzuleitungen und das maximale Einspritzvolumen der Spritzen. Mit Hilfe von Knöpfen lassen sich die drei Spritzenstempel nach oben oder nach unten fahren. Durch Angabe eines einzuspritzenden Volumens für jede der drei Spritzen wird eben dieses Volumen in das Kalorimeterinnengefäß eingespritzt.

2.4.7 Der Menüpunkt Kalorimetrie

Im Menüpunkt Kalorimetrie kann festgelegt werden, mit welcher Abtastrate der AD-Wandler, der die Temperaturinformationen liefert, ausgelesen werden soll. Diese Temperatur / Zeitdaten werden grafisch angezeigt und können nach Angabe einer Zielfeile abgespeichert werden.

Kapitel 3

Experimentelles

3.1 Synthese einer Mizellprobe

Schmelzpunkte von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure, 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat und 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien wurden auf einem DTA-Gerät Linseis L62 gemessen, alle anderen Schmelzpunkte auf einer Büchi 510 Schmelzpunktapparatur. Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert angegeben.

3.1.1 Sulfonieren von 2-Methylpyridin mit rauchender Schwefelsäure

nach S.M. McElvain und M.A. Goese *JACS* **65**, 2233–2236 (1943) [35]

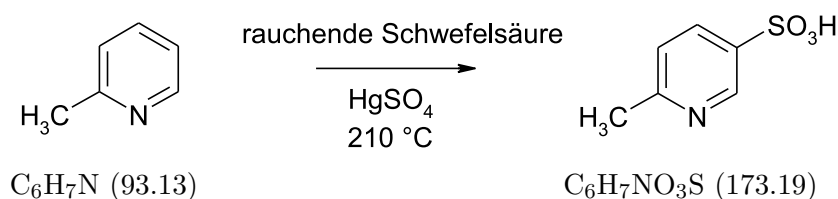


Abbildung 3.1: Sulfonieren von 2-Methylpyridin

Durchführung der Reaktion

Man legt 150 g eiskalte rauchende Schwefelsäure (65% SO_3 , 1.22 mol SO_3) und 1.5 g Quecksilber-II-sulfat ($M = 296.65$ g/mol, 5 mmol) vor und tropft mittels Tropftrichter durch einen Rückflußkühler langsam über einen Zeitraum von 20 Minuten 46.5 g frisch destilliertes 2-Methylpyridin (0.5 mol) zu. Mit einem Silikonölbad wird nun 24 Stunden auf 210°C erhitzt. Entweichendes Schwefeltrioxidgas wird in einer mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllten Waschflasche aufgefangen.

Isolierung und Reinigung

Abweichend von der Vorschrift gießt man auf ca 1.5 l zerstoßenes Eis in einem 5 l Erlenmeyerkolben. Nach dem Schmelzen des Eises filtert man vom Quecksilbersulfat ab. Dann wird bis nahe zum Sieden erhitzt und solange Calciumcarbonat zugeben, bis keine CO₂-Entwicklung mehr eintritt. Gefälltes Calciumsulfat wird mehrmals über eine Fritte abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Zum Fällern des gelösten Quecksilbersulfats setzt man eine Spatelspitze Natriumsulfid zu und filtert nach dem Abkühlen durch einen Faltenfilter. Das Filtrat wird eingedampft, bis sich Kristalle bilden. Man nimmt in wenig Wasser auf, filtriert ab und dampft wiederum ein. Nun wird mit 500 ml Isopropanol versetzt, 2 Stunden gerührt und abgesaugt. Man nimmt nochmal in 100 ml Wasser auf, filtert und dampft wiederum ein. Das Produkt wird in 400 ml Isopropanol 3 Stunden refluxiert, danach abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 35.50 g sandfarbene Kristalle (173.19 g/mol, 206 mmol, 41.2 %, Lit.: 60 %).

Schmelzpunkt: 383 - 386°C (Lit.: 338 - 341°C).

NMR: 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure in D₂O

Proton	Shift (ppm)	J (Hz)	Kopplungen	Anzahl
H-6	8.63	2.38, 0.91	H-6 H-4, H-6 H-3	1
H-4	7.95	8.22, 2.38	H-4 H-3, H-4 H-6	1
H-3	7.31	8.22, 0.90, 0.45	H-3 H-4, H-3 H-6, H-3 CH ₃	1
CH ₃	2.44			3

Tabelle 3.1: NMR-Daten von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure in D₂O

3.1.2 Methylierung von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure

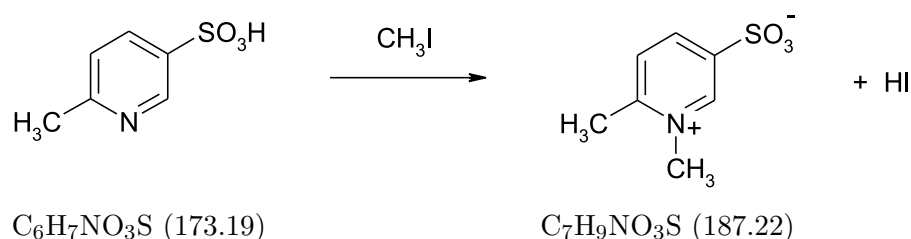


Abbildung 3.2: Methylierung von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure

Durchführung der Reaktion

Zu 27.00 g 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure (173.19 g/mol, 156 mmol) gibt man 12 ml Jodmethan (2.28 g/ml, 141.94 g/mol, 0.19 mol) und 200 ml o-Dichlorbenzol und hält die Mischung 20 Stunden bei 120°C.

Isolierung und Reinigung

Das Produkt wird über eine grosse Fritte abgesaugt und gut mit Chloroform gewaschen. Zum Trocknen gibt man ins Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 26.06 g beigefarbene Kristalle (187.22 g/mol, 139 mmol, 88.7 %).

Schmelzpunkt: 349 - 351°C.

NMR: 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat in D₂O

Proton	Shift (ppm)	Kopplungskonstante (Hz)	Kopplungen	Anzahl
H-6	9.00	2.30	H-6 H-4	1
H-4	8.53	8.32, 2.30	H-4 H-3, H-4 H-6	1
H-3	7.91	8.32	H-3 H-4	1
N-CH ₃	4.18			3
C-CH ₃	2.73			3

Tabelle 3.2: NMR-Daten von 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat in D₂O

3.1.3 Synthese von N-Cyclohexylethanimin

nach J.J. Lalonde, D.E. Bergbreiter und M. Newcomb *JACS* **51**, 1369–1372 (1986) [36]

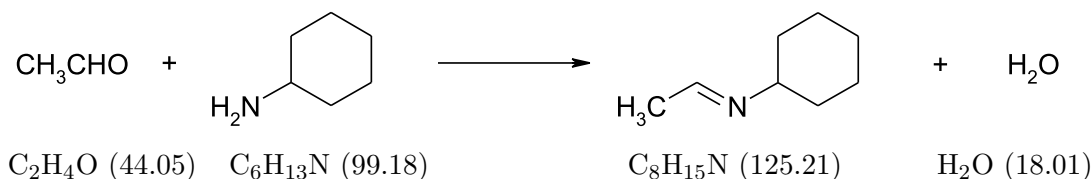


Abbildung 3.3: Synthese von N-Cyclohexylethanimin

Durchführung der Reaktion

Zu 30 ml eisgekühltem Cyclohexylamin (0.87 g/ml, 99.18 g/mol, 263 mmol) tropft man langsam 10 ml kaltes Acetaldehyd (0.78 g/ml, 44.05 g/mol, 177 mmol). Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur gibt man 2.3 g KOH Plättchen zu, rührt weitere 15 min und entfernt anschliessend mit einer Pasteurpipette die wässrige Phase.

Isolierung und Reinigung

Das Rohprodukt wird im Wasserstrahlvakuum destilliert.

Ausbeute: 12.0 g farblose Flüssigkeit (125.21 g/mol, 96 mmol, 54 %, Lit.: 57 %).

Siedepunkt: 47 - 49°C / 16 Torr (Lit.: 46 - 48°C / 18 Torr).

NMR: N-Cyclohexylethanimin in Benzol-d₆

Proton	Shift (ppm)	Aufspaltung	Kopplungen	Anzahl
C-CH=N	7.34	Quartett	C-CH=N H ₃ C	1
N-CH	2.82	Quintett	N-CH CH-(CH ₂) ₂	1
H ₃ C	1.68	Dublett	H ₃ C C-CH=N	3
(CH ₂) ₅	1.77 - 0.89	Multiplett	CH ₂ CH ₂	10

Tabelle 3.3: NMR-Daten von N-Cyclohexylethanimin in Benzol-d₆

3.1.4 Synthese von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal

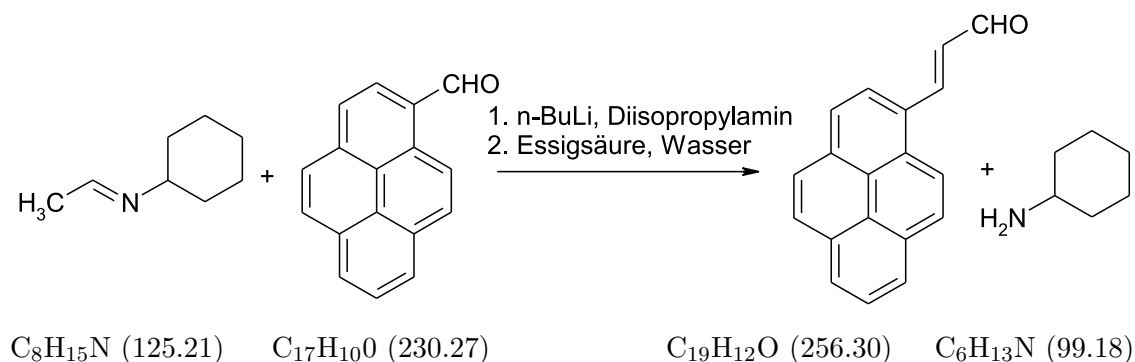


Abbildung 3.4: Synthese von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal

Durchführung der Reaktion

14 ml Diisopropylamin (0.72 g/ml, 101.19 g/mol, 100 mmol) werden in 100 ml abs. THF vorgelegt und mit einem Aceton / Trockeneisbad auf -78°C gekühlt. Dann gibt man unter einem Stickstoffstrom 60 ml 15 %ige n-Butyllithiumlösung in n-Hexan (0.68 g/ml, 64.06 g/mol, 96 mmol) zu. Man lässt auf Raumtemperatur erwärmen und setzt 12.0 g frisch bereitetes N-Cyclohexylethanimin (125.21 g/mol, 96 mmol) zu. Nach 30 Minuten wird nochmals auf -78°C gekühlt und eine Lösung von 10.0 g 1-Pyrenecarboxaldehyd (230.27 g/mol, 43.4 mmol) in 100 ml abs. THF zugesetzt. Nun lässt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren.

Isolierung und Reinigung

Zur Lösung tropft man bei -78°C 100 ml Essigsäure (1.05 g/ml, 60.05 g/mol, 1.75 mol) und lässt auf Raumtemperatur erwärmen. Danach gießt man in 350 ml 15%ige wässrige Natriumacetatlösung ein und rührt bei Raumtemperatur solange, bis sich ein Bodensatz bildet. Nach Abgiessen der wässrigen Phase nimmt man in wenig Methylenchlorid auf und chromatographiert zweimal über Kieselgel 60 mit Methylenchlorid. Man erhält 1.60 g orangefarbenes Rohprodukt mit Schmelzpunkt $169 - 170^\circ\text{C}$. Nach zweimaligem Umkristallisieren in 25 ml Toluol ergeben sich orangefarbene Kristalle, welche im Ölpumpenvakuum getrocknet werden.

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel 60 und Methylenchlorid: $R_f = 0.50$, Reverse Phase C18 und Methanol: $R_f = 0.54$, Produkt fluoresziert grün.

Ausbeute: 0.95 g orange Kristalle (256.30 g/mol, 3.71 mmol, 8.5 %).

Schmelzpunkt: $171 - 172^\circ\text{C}$.

NMR: 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in CDCl_3

Proton	Shift (ppm)	J (Hz)	Kopplungen	Anzahl
CHO	9.95	7.68	CHO =CH-	1
CH-Py	8.64	15.66	CH-Py =CH-	1
=CH-	7.03	15.66, 7.68	=CH- CH-Py, =CH- CHO	1
Py-H	8.50 - 8.04			9

Tabelle 3.4: NMR-Daten von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in CDCl₃

3.1.5 Kondensation von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat

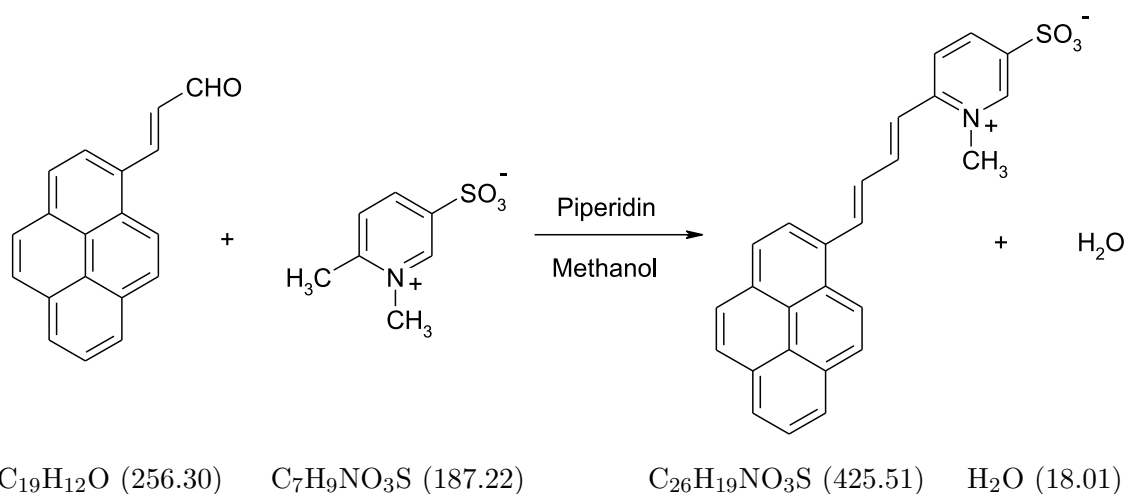


Abbildung 3.5: Kondensation von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit 1,2-Dimethylpyridin-1-ium -5-sulfonat

Durchführung der Reaktion

0.90 g 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat (187.22 g/mol, 4.81 mmol) werden mit 1.50 g 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal (5.85 mmol) in 30 ml Methanol unter Zusatz von 2 Tropfen Piperidin 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Isolierung und Reinigung

Das Produkt wird abgesaugt und mit Chloroform und Wasser gewaschen.

Ausbeute: 1.53 g rote Kristalle (425.51 g/mol, 3.59 mmol, 74.6 %).

Dünnschichtchromatographie: Reverse Phase C18 und Methanol: $R_f = 0.80$, Produkt zeigt rote Fluoreszenz.

Schmelzpunkt: 384°C (Zersetzung).

Elementaranalyse: C: 70.99 (ber. 73.39), H: 4.55 (ber. 4.50), N: 3.05 (ber. 3.29)

Massenspektrum in CH₃CN: $MH^+ = 426.1$ u

NMR: 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in DMSO-d₆

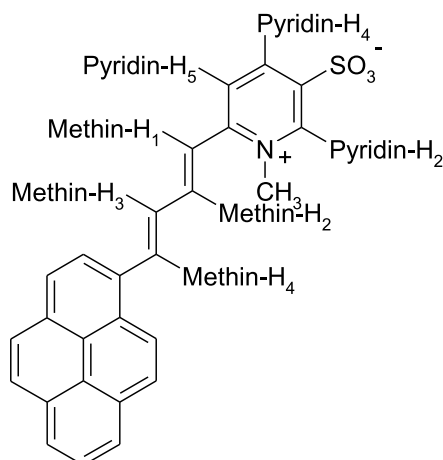


Abbildung 3.6: Abbildung von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien

Proton	Shift (ppm)	J (Hz)	Kopplungen	Anzahl
Pyridin-H ₂	9.12	1.82	Pyridin-H ₂ Pyridin-H ₄	1
Pyridin-H ₄	8.56	8.60, 1.82	Pyridin-H ₄ Methin-H ₁ , Pyridin-H ₄ Pyridin-H ₂	1
Pyridin-H ₅	8.45	15.24	Pyridin-H ₅ Methin-H ₂	1
Methin-H ₁	8.40	8.60	Methin-H ₁ Pyridin-H ₄	1
Methin-H ₂	8.08	15.25, 10.36	Methin-H ₂ Pyridin-H ₅ , Methin-H ₂ Methin-H ₃	1
Methin-H ₃	7.70	15.17, 10.34	Methin-H ₃ Methin-H ₄ , Methin-H ₃ Methin-H ₂	1
Methin-H ₄	7.26	15.16	Methin-H ₄ Methin-H ₃	1
Pyren-H	8.65 - 8.19			9
N-CH ₃	4.33, 4.32, 4.28			3

Tabelle 3.5: NMR-Daten von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien

3.1.6 Reaktion von Zimtaldehyd mit Malonsäure in Gegenwart von Pyridin

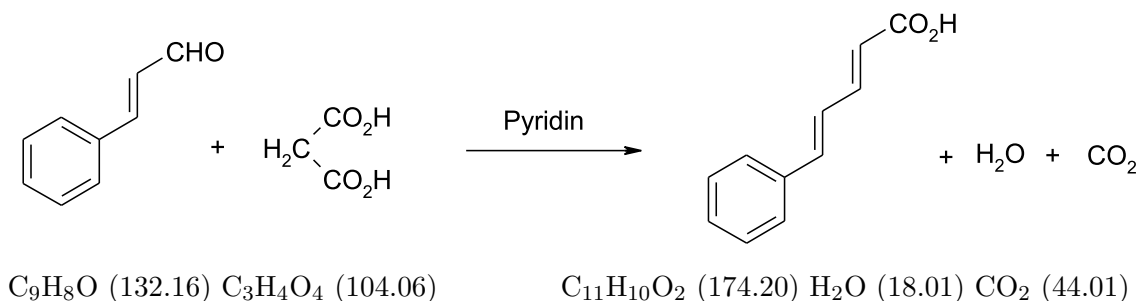


Abbildung 3.7: Reaktion von Zimtaldehyd mit Malonsäure in Gegenwart von Pyridin

Durchführung der Reaktion

23.93 g Malonsäure (104.06 g/mol, 230 mmol) und 30.40 g frisch destillierter Zimtaldehyd (132.16 g/mol, 230 mmol) werden in einem 250 ml Rundkolben mit 15.82 g destilliertem Pyridin (200 mmol, 79.10 g/mol) gerührt, bis sich die Malonsäure gelöst hat. Man setzt einen Rückflußkühler und einen Blasenähler auf und erhitzt unter Rückfluß zum Sieden. Nach Beendigung der Gasentwicklung (nach etwa 3 Stunden) läßt man abkühlen und versetzt den eisgekühlten Kolbeninhalt mit einer eiskalten Lösung von 8.5 ml konzentrierter Schwefelsäure in 20 ml Wasser.

Isolierung und Reinigung

Die Mischung wird 2 Stunden im Eisbad gekühlt, das Rohprodukt anschließend abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen, wiederum gut abgesaugt und im Exsikkator getrocknet. Das Rohprodukt wird in Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7.05 g farblose Kristalle (174.20 g/mol, 40.5 mmol, 17.6 %).

Schmelzpunkt: 155°C.

NMR: 5-Phenylpenta-2,4-diensäure in CDCl_3

Proton	Shift (ppm)	Aufspaltung	Anzahl
COOH	12.5 - 12.0		1
	7.57 - 7.53	Multipllett	2
Phenyl-H	7.41 - 7.28	Multipllett	4
	7.16 - 7.00	Multipllett	2
	6.03 - 5.97	Dublett	1

Tabelle 3.6: NMR-Daten von 5-Phenylpenta-2,4-diensäure in CDCl_3

Malonsäure wurde mit 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in frisch destilliertem Pyridin analog zu obiger Vorschrift umgesetzt und das Rohprodukt mit Kieselgel 60 und Methylenchlorid, dem 5 Volumenprozent Methanol beigemischt wurden, chromatographiert. Es konnte keine 5-(Pyrenyl-1)-penta-2,4-diensäure isoliert werden.

3.1.7 Reaktion von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit Malonsäurediethylester in Gegenwart von Piperidin und Benzoesäure

siehe Organic Syntheses, Vol. 25, S 42-44

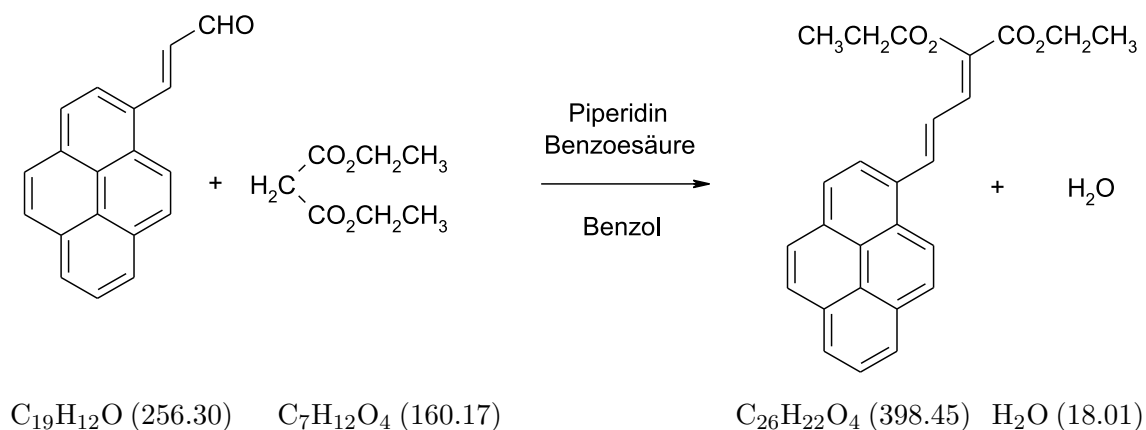


Abbildung 3.8: Reaktion von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit Malonsäurediethylester in Gegenwart von Piperidin und Benzoesäure

Durchführung der Reaktion

1.35 g 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal (5.27 mmol), 25 μ l Piperidin ($d = 0.86$ g/ml, $M = 85.14$ g/mol, 0.25 mmol), 20 mg Benzoesäure ($M = 122.12$ g/mol, 0.16 mmol) und 900 μ l Malonsäurediethylester ($d = 1.05$ g/ml, $M = 160.17$ g/mol, 5.9 mmol) werden zusammen mit 50 ml Benzol in einen 100 ml Rundkolben gegeben. Man setzt einen Wasserabscheider und einen Rückflußkühler auf. Die Reaktionsmischung wird 3 Stunden refluxiert.

Isolierung und Reinigung

Nach dem Abkühlen chromatographiert man die Reaktionsmischung über Kieselgel 60 mit Methylenchlorid. Man eluiert eine rote Hauptbande. Das gelöste Produkt fluoresziert nicht. Umkristallisiert wird zweimal in Cyclohexan. Nach dem Absaugen der gelben Kristalle trocknet man im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 1.40 g gelbe Kristalle (398.45 g/mol, 3.05 mmol, 57.8 %).

Schmelzpunkt: 92 - 93°C.

NMR: 4-(Pyrenyl-1)-1,1'-(diethoxycarbonyl)-buta-1,3-dien in CDCl_3

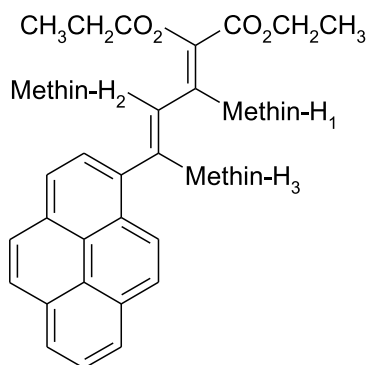


Abbildung 3.9: Abbildung von 4-(Pyrenyl-1)-1,1'-(diethoxycarbonyl)-buta-1,3-dien

Proton	Shift (ppm)	J (Hz)	Kopplungen	Anzahl
Pyren-H	8.43 - 7.99			9
Methin-H ₁	8.16	14.98	Methin-H ₁ Methin-H ₂	1
Methin-H ₂	7.57	11.71, 14.98	Methin-H ₂ Methin-H ₃ , Methin-H ₂ Methin-H ₁	1
Methin-H ₃	7.78	11.71	Methin-H ₃ Methin-H ₂	1
CO ₂ CH ₂	4.47 - 4.30		CO ₂ CH ₂ CH ₃	4
CH ₃	1.45 - 1.35		CH ₃ CO ₂ CH ₂	6

Tabelle 3.7: NMR-Daten von 4-(Pyrenyl-1)-1,1'-(diethoxycarbonyl)-buta-1,3-dien

Eine anschließende Verseifung von 1.05 g 4-(Pyrenyl-1)-1,1'-(diethoxycarbonyl)-buta-1,3-dien mit Kaliumhydroxid in 2-Propanol bei Raumtemperatur ergab 0.95 g wasserlösliche gelbe Kristalle. Behandlung mit Essigsäure und nachfolgende Aufreinigung des Rohprodukts mittels Chromatographie mit Kieselgel 60 und Methylenchlorid, dem 5 Volumenprozent Methanol beigemischt wurden, ergab kein 4-(Pyrenyl-1)-buta-1,3-dien-1,1'-dicarbonsäure.

3.1.8 Bromierung von Dipropylenglykolmonomethylether durch Phosphortribromid

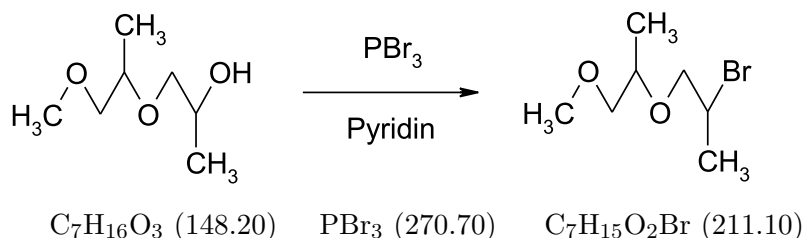


Abbildung 3.10: Reaktion von Dipropylenglykolmonomethylether mit Phosphortribromid

Durchführung der Reaktion

Man legt 20 ml Phosphortribromid (270.70 g/mol, 2.85 g/ml, 210 mmol) in einen 500 ml Dreihalskolben mit KPG-Rührer vor und kühlt mittels eines Eisbades. 60 ml Dipropylenglykolmonomethylether (148.20 g/mol, 0.951 g/ml, 385 mmol) wird mit 15 ml Pyridin in einen 100 ml Tropftrichter gegeben und auf den Dreihalskolben aufgesetzt. Über einen Zeitraum von 20 Minuten lässt man die Mischung zutropfen und rührt dann eine Stunde bei 50°C. Vorschrift nach [37]

Isolierung und Reinigung

Man destilliert die Reaktionsmischung im Ölpumpenvakuum. Das Rohprodukt geht bei 180 °C Ölbadtemperatur über. Das Destillat wird mit verdünnter Schwefelsäure und dann mehrmals mit Wasser gewaschen. Die (untere) organische Phase wird mit CaCl_2 getrocknet und danach einer fraktionierenden Destillation unterworfen.

Ausbeute: 9.3 g farblose Flüssigkeit (211.10 g/mol, 44 mmol, 11.4 %).

Siedepunkt: 86 - 88 °C / 16 Torr.

NMR: 1-Bromo-2,4-dimethyl-3,6-dioxaheptan, 1-Bromo-2,5-dimethyl-3,6-dioxaheptan, 2-Bromo-5-methyl-4,7-dioxaoctan und 2-Bromo-6-methyl-4,7-dioxaoctan in CDCl_3 .

Dieses Isomerengemisch wird in der Folge als Dowanolbromid bezeichnet.

Proton	Shift (ppm)	Aufspaltung	Anzahl
CH	4.22 - 4.10	Multipllett	1
CH_3O	3.39 - 3.37	Multipllett	3
CH, CH_2 , CHBr , CH_2Br	3.80 - 3.30	Multipllett	5
CH_3C	1.72 - 1.68, 1.18 - 1.14	Multipllett	6

Tabelle 3.8: NMR-Daten von Dowanolbromid in CDCl_3

3.1.9 Reaktion von Dowanolbromid mit 4-Hydroxybenzaldehyd

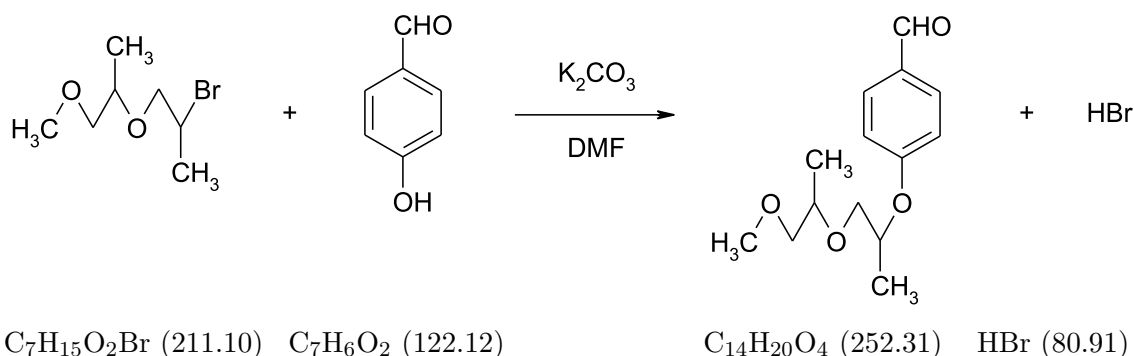


Abbildung 3.11: Umsetzung von Dowanolbromid mit 4-Hydroxybenzaldehyd

Durchführung der Reaktion

5.5 g 4-Hydroxybenzaldehyd (122.12 g/mol, 45 mmol) werden mit 8.6 g Dowanolbromid (211.10 g/mol, 40.7 mmol) und 4 g Kaliumcarbonat in 20 ml Dimethylformamid 2.5 Stunden refluxiert.

Isolierung und Reinigung

Die Reaktionsmischung wird mit Ethylacetat und Wasser ausgeschüttelt; die organische (obere) Phase anschliessend dreimal mit 100 ml 1 molarer KOH Lösung und danach nochmals mit Wasser. Die organische Phase wird mit Calciumchlorid getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Die erhaltene gelbe Flüssigkeit wird mit Methylenchlorid über Kieselgel 60 chromatographiert bis das nicht umgesetzte Dowanolbromid von der Säule eluiert ist (mit einer UV-Handlampe lässt es sich als blau fluoreszierende Bande erkennen). Danach wird dem Methylenchlorid 10 Volumenprozent Tetrahydrofuran zugemischt und damit das Produkt eluiert.

Ausbeute: 3.8 g gelbe Flüssigkeit (252.31 g/mol, 15 mmol, 37%).

NMR: 4-(2,5-Dimethyl-1,4,7-trioxaoctanyl)benzaldehyd,
 4-(3,6-Dimethyl-1,4,7-trioxaoctanyl)benzaldehyd,
 4-(2,6-Dimethyl-1,4,7-trioxaoctanyl)benzaldehyd und
 4-(3,5-Dimethyl-1,4,7-trioxaoctanyl)benzaldehyd in CDCl_3 .

Dieses Isomerengemisch wird in der Folge als Dowanolbenzaldehyd bezeichnet.

Proton	Shift (ppm)	Aufspaltung	Anzahl
CHO	9.87	Singlett	1
CH aromatisch	7.81, 7.02	2 Dubletts	4
CH aliphatisch	4.73 - 4.62	Multiplett	1
CH_3O	3.36 - 3.33	Multiplett	3
CH, CH_2	3.77 - 3.27	Multiplett	5
CH_3C	1.43 - 1.27, 1.17 - 1.10	Multiplett	6

Tabelle 3.9: NMR-Daten von Dowanolbenzaldehyd in CDCl_3

3.1.10 Umsetzung von Dowanolbenzaldehyd mit Pyrrol

nach Richard P. Bonar-Law *J. Org. Chem.* **61**, 3623–3634 (1996) [22]

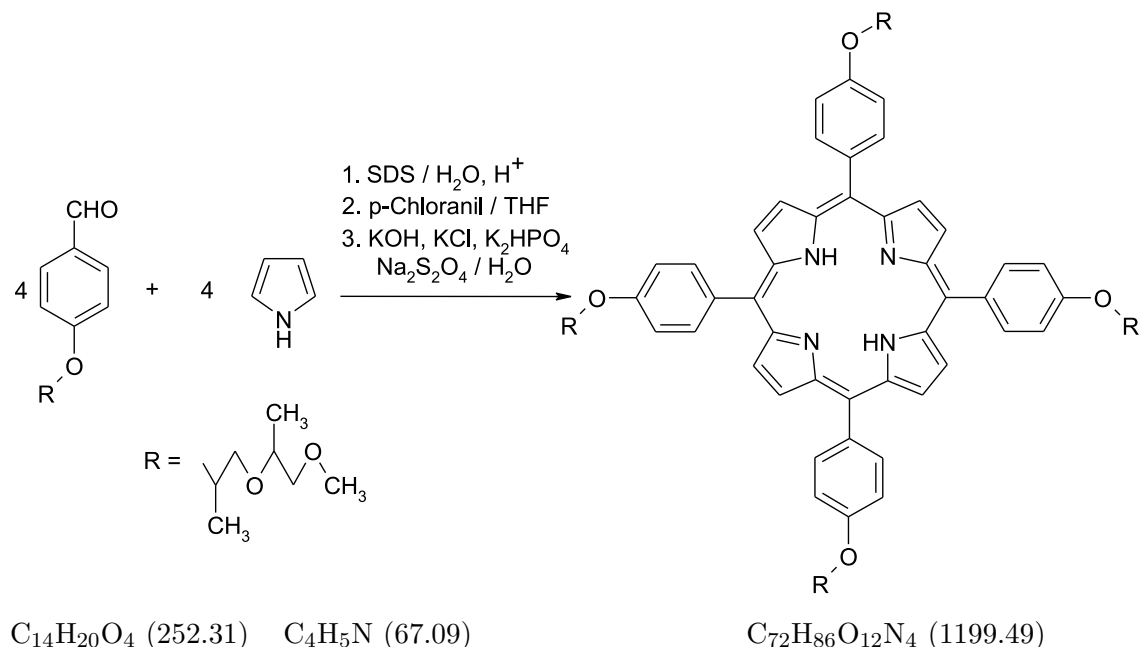


Abbildung 3.12: Umsetzung von Dowanolbenzaldehyd mit Pyrrol

Durchführung der Reaktion

4.30 g Dowanolbenzaldehyd (252.31 g/mol, 17 mmol) und 1.20 ml frisch destilliertes Pyrrol ($d = 0.966$ g/ml, 1.16 g, 17.3 mmol) werden in einem 2 l Rundkolben in einer Lösung von 250 g Natriumdodecylsulfat (288.38 g/mol, 867 mmol) in 1.8 l Millipore Wasser gerührt. Nach 1.5 Stunden fügt man 16 ml konzentrierte Salzsäure (32 %ig, 36.46 g/mol, 1.16 g/ml, 163 mmol) hinzu, daraufhin ändert sich die Farbe der Lösung von schwach gelb nach orange. Nach weiteren 1.5 Stunden ist die Farbe nun dunkelrot geworden. Man fügt eine Lösung von 3.6 g p-Chloranil (245.88 g/mol, 14.6 mmol) in 200 ml THF auf einmal zu und lässt über Nacht rühren.

Isolierung und Reinigung

Man bereitet eine Lösung von 18 g Kaliumhydroxid (56.11 g/mol, 321 mmol), 10 g Natriumdithionit (174.11 g/mol, 57.4 mmol), 40 g di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat (228.23 g/mol, 175 mmol) und 40 g Kaliumchlorid (74.56 g/mol, 536 mmol) in 200 ml Wasser und gibt sie zusammen mit der Reaktionslösung in einen 5 l Erlenmeyerkolben. Man lässt 20 Minuten stark rühren, dann setzt man jeweils ca. 0.5 l Ethylacetat und Petrolether hinzu und rührt weiter. Nach einer Stunde bricht man die entstandene Emulsion auf durch Zusatz eines grossen Überschusses an festem Kaliumchlorid. Das ausgefallene Kaliumdodecylsulfat wird über eine grosse Fritte abgesaugt, mit Ethylacetat nachgewaschen und das Filtrat im Scheidetrichter nach organischer und wässriger Phase aufgetrennt. Dann rotiert man die organische Phase bis auf ca. 300 ml ein, filtriert durch einen Faltenfilter und setzt dem Filtrat ca. 10 g Kieselgel 60 hinzu, bevor man es völlig abrotiert. Das erhaltene schwarze Kieselgelpulver chromatographiert man über ca. 80 g Kieselgel 60 mit

Methylenchlorid, dem 5 Volumenprozent THF beigelegt werden. Man sammelt die violette Bande, die unter Zuhilfenahme einer UV-Handlampe leicht als stark rot fluoreszierende Bande zu erkennen ist. Nochmaliges Chromatographieren des Porphyrins liefert sauberes Produkt.

Ausbeute: 1.10 g violette langsam kristallisierende Flüssigkeit (1199.49 g/mol, 917 μ mol, 21.5%).

Schmelzpunkt: 158 - 161°C.

Das Porphyrin wird in Methylenchlorid aufgenommen und durch Zusatz von Petrolether ausgefällt. Nach zwei Tagen werden die sich bis dahin gebildeten violetten Kristalle 5 Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.93 g violette Kristalle (1199.49 g/mol, 775 μ mol, 18.2%).

Schmelzpunkt: 172 - 174°C.

NMR: meso-Tetrakis(4-(2,5-dimethyl-1,4,7-trioxaoctanyl)phenyl)porphyrin und weitere Regio- bzw. Stereoisomere in CDCl_3 .

Proton	Shift (ppm)	Aufspaltung	Anzahl
CH Pyrrol	8.91	Singlett	8
CH aromatisch	8.13, 7.33	2 Dubletts	16
CH aliphatisch	4.93 - 4.83	Multiplett	4
CH_3O	3.48 - 3.46	Multiplett	12
CH, CH_2	4.01 - 3.38	Multiplett	20
CH_3C	1.60 - 1.52, 1.34 - 1.22	Multiplett	24
NH	-2.72	Singlett	2

Tabelle 3.10: NMR-Daten des Tetraphenylporphyrinderivats in CDCl_3

Elementaranalyse: C: 71.96 (ber. 72.10), H: 7.25 (ber. 7.23), N: 4.45 (ber. 4.67)

Massenspektrum in $CHCl_3$: $MH^+ = 1199.7$ u, $(M + 2H^+)^{2+} = 600.6$ u

DUSCHL PORPHYRIN, 48 MG IN 1.1 ML $CDCl_3$, REF.: TMS EXTERN

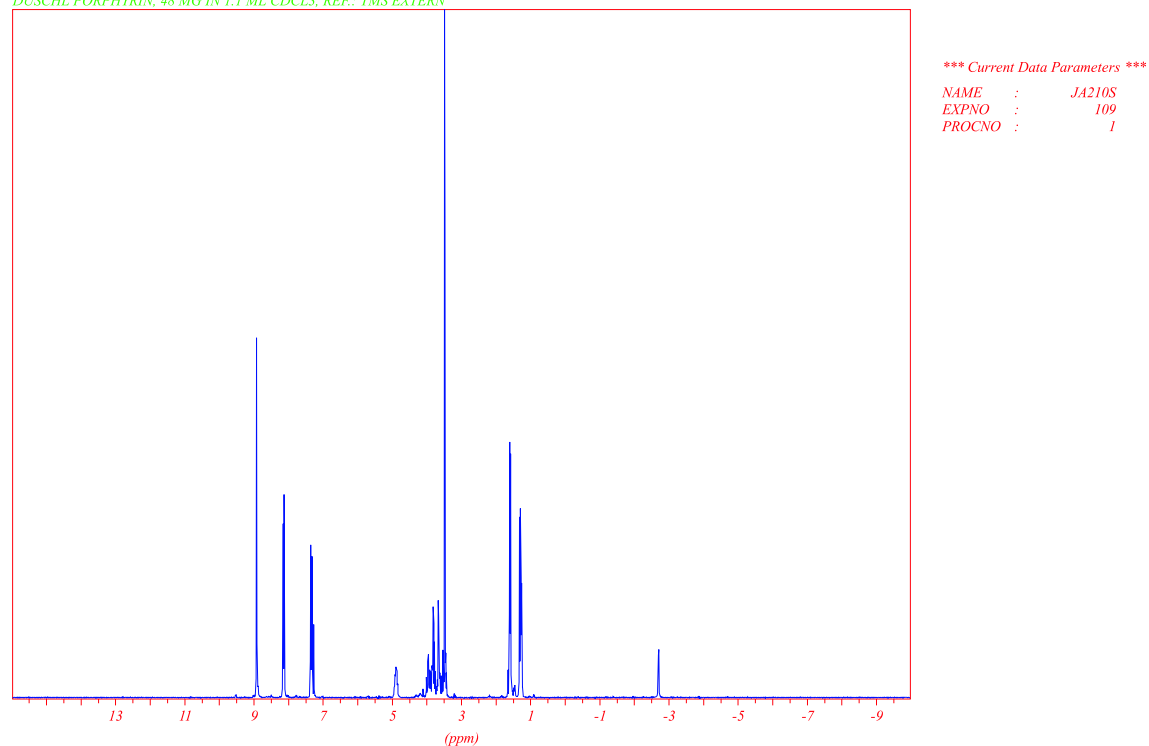


Abbildung 3.13: Abbildung des NMR-Spektrums des Tetraphenylporphyrinderivates

3.2 Fluoreszenzmessungen mit der Porphyrinsonde

3.2.1 Herstellung von Tensidlösungen, die das Porphyrinmolekül enthalten

3.2.1.1 Verwendete Chemikalien

Das verwendete reine Wasser wurde mit einer Milli-Q-Anlage der Firma Millipore produziert und besitzt eine Leitfähigkeit von unter 10^{-6} Sm^{-1} . Tetradecyldimethylaminoxid (C_{14}DMAO) wurde freundlicherweise von Prof. Hoffmann, Uni Bayreuth, zur Verfügung gestellt. Es wurde zuvor aus wäßriger Stammlösung lyophilisiert und anschließend zweimalig aus Aceton umkristallisiert. Alle weiteren verwendeten Chemikalien sind aus Tabelle 3.11 ersichtlich. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung oder Trocknung eingesetzt.

Chemikalie	Reinheit	Bezugsquelle
Diethylether	$\geq 99.5 \%$	Roth
Tetrahydrofuran	$\geq 99.5 \%$	Merck
1-Hexanol	99 %	Lancaster
Natriumdodecylsulfat	$\geq 99 \%$	Merck
Dodecyltrimethylammoniumbromid	99 %	Acros
Natriumdecylsulfat	99 %	Lancaster
Natriumoctylsulfat	99 %	Lancaster

Tabelle 3.11: Verwendete Chemikalien

3.2.1.2 Vorgehensweise zur Solubilisierung des Fluorophors in Tensidlösungen

Der kristallin vorliegende Porphyrinfarbstoff löst sich nicht direkt in Tensidlösungen, darum wird der Farbstoff zunächst in einem organischen Lösungsmittel gelöst und so in Mizellen eingebracht. Danach läßt man das Lösungsmittel verdampfen und filtriert den nicht gelösten Farbstoff ab.

In einer Kristallisierschale mit 11 cm Durchmesser wurde auf einer Oberschalenwaage PB 1502 der Firma Mettler (Auflösung 10 mg) eine bestimmte Masse an Tensid ausgewogen, die vorher aufgrund der benötigten Endkonzentration des Tensids und einem Volumen von 50 ml berechnet wurde. Man löst nun ca 5 mg des Porphyrinfarbstoffes in 20 ml Diethylether und gibt diese Lösung in die Kristallisierschale. Erst danach fügt man etwa 25 ml Millipore Wasser hinzu und schwenkt die Flüssigkeit in der Schale solange, bis sich alles Tensid gelöst und sich eine homogene Lösung gebildet hat. Dann gibt man weitere 20 ml Millipore Wasser und einen Rührfisch hinzu und erwärmt diese Lösung auf 50°C für 10 Minuten. Nachdem der Ether verdampft ist, filtriert man die Lösung mit Hilfe einer Spritze durch einen Spritzenfilter mit $0.2 \mu\text{m}$ Porengröße in einen 50 ml Meßzylinder und füllt bis zur Eichmarke auf. Die Konzentration des Fluorophors beträgt ungefähr $80 \mu\text{mol/l}$. Da die Konzentration der Mizellen mindestens $800 \mu\text{mol/l}$ beträgt, sollte pro Mizelle höchstens ein Porphyrinmolekül gelöst sein.

Falls ein Alkohol mit mittlerer Kettenlänge als Cotensid zugesetzt werden soll, wird ebenfalls die benötigte Masse berechnet und dieser auf einer Oberschalenwaage mit einer Pasteurpipette zugegeben, bevor man mit Wasser bis zur Eichmarke auffüllt. Man schüttelt solange, bis alles ausgefallene Tensid sich wieder gelöst hat. Alle Lösungen sind nach dem Filtrieren transparent.

Die benötigten Lösungen wurden mehrere Tage zuvor hergestellt und im Thermokonstantraum bei 25°C unter Lichtausschluß gelagert, bevor sie vermessen wurden.

3.2.2 Aufzeichnung eines Absorptions- und Emissionsspektrums des Porphyrinfluorophors in mizellarer Lösung

Ein Absorptionsspektrum des Fluorophors in 0.22 molarer SDS-Lösung wurde mit dem Absorptionsphotometer Cary 50 der Firma Varian gefahren. Ein entsprechendes Emissionsspektrum wurde mit dem Fluorimeter Aminco Series 2 der Firma SLM erstellt. Beide Geräte befinden sich am Lehrstuhl Prof. Wolfbeis und wurden mit freundlicher Genehmigung benutzt.

3.2.3 Aufzeichnung eines Anregungsanisotropiespektrums des Porphyrinfluorophors in Propylenglykol

Ein Anregungsanisotropiespektrum des Porphyrinfluorophors in Propylenglykol bei -70°C wurde zwischen 425 und 670 nm mit einem Fluorimeter der Firma Edinburgh Instruments der Arbeitsgruppe von Prof. Fidler in Prag aufgezeichnet. Dieses Spektrum ergab sich durch Messung des G-Faktors dieses Instrumentes bei der Emissionswellenlänge von 680 nm und durch Messung zweier Anregungsspektren des Porphyrins mit vertikal polarisierter Anregung und vertikaler bzw. horizontaler Emissionspolfilterstellung. Die in Abbildung 4.16 gezeigten Werte errechnen sich nach Formel 2.11.

3.2.4 Bestimmung von Fluoreszenzabklingdauer und Rotationskorrelationszeit der Porphyrinsonde in mehreren binären und ternären Tensidsystemen

Messungen wurden an 0.22 molaren wäßrigen C₁₂TAB-Lösungen, sowie an gleichkonzentrierten C₁₂TAB-Lösungen, denen 0.11 mol/l Hexanol zugesetzt wurde, vorgenommen. Detaillierte Daten über die Gestalt der gebildeten Mizellen liegen für dieses System vor, siehe Tabelle 1.2. Eine weitere Meßreihe wurde für ein ternäres System Wasser, SDS und Tetradecyldimethylaminoxid mit einer Gesamtkonzentration der Tenside von 60 mmol/l durchgeführt. Über das SDS / C₁₄DMAO System liegen ebenfalls Daten über die Mizellgestalt publiziert vor, siehe Tabelle 1.3. Ebenso wurden wäßrige 0.43 molare Natriumoctylsulfat- und 0.38 molare Natriumdecylsulfatlösungen vermessen, sowie eine SDS-Lösung in einer Konzentration von 0.22 mol/l.

Kapitel 4

Darstellung der Messergebnisse

4.1 Spektroskopische Charakterisierung der Fluorophore

4.1.1 Absorptions- und Emissionsmessungen der Proben

4.1.1.1 Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektren von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in verschiedenen Lösungsmitteln

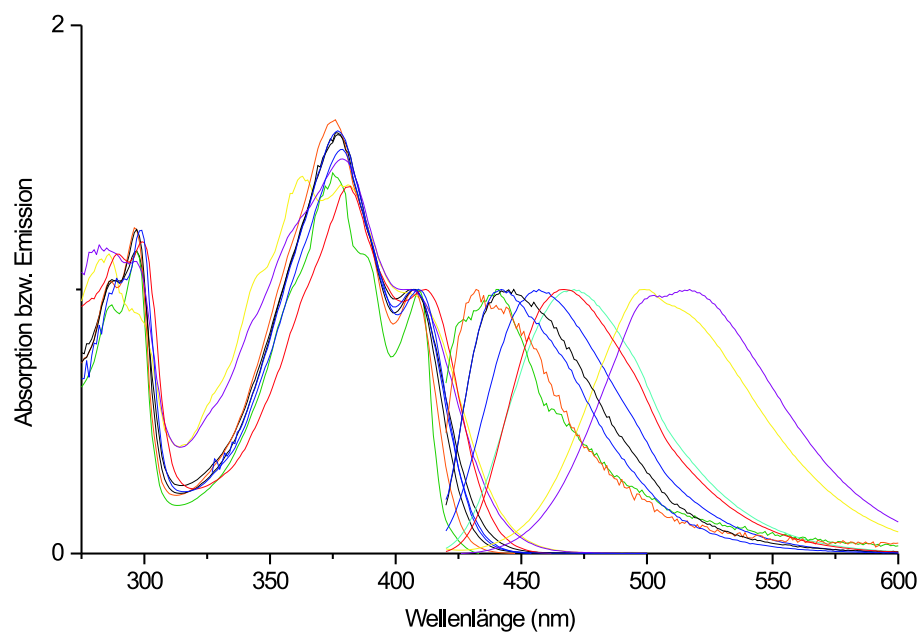


Abbildung 4.1: Absorptions- und Emissionsspektren von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in verschiedenen Lösungsmitteln. Anregungswellenlänge: 380 nm, Normierung der Maxima der längstwelligen Absorptionsbande und der Emissionsbande auf den Wert 1.0

In Abbildung 4.1 werden auf der linken Seite (von 275 nm bis 475 nm) die Absorptionsspektren von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in verschiedenen Lösungsmitteln gezeigt. Auf

Lösungsmittel	ϵ	n	Abs.-max (nm)	Em.-max (nm)	$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F (cm^{-1})$
THF	8.0	1.407	409	442	1826
Aceton	20.70	1.357	407	457	2625
Acetonitril	35.94	1.342	406	471	3400
Diethylether	4.3	1.353	407	432	1422
Ethylacetat	6.0	1.372	407	447	2199
Methylenchlorid	9.0	1.424	412	467	2859
Ethanol	24.30	1.359	400	499	4960
Methanol	32.50	1.329	405	517	5349

Tabelle 4.1: Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in verschiedenen Lösungsmitteln

der rechten Seite dieser Abbildung (von 420 nm bis 600 nm) sind die Emissionsspektren dieses Fluorophors abgebildet. Die Absorptionskoeffizienten ϵ von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal betragen in Methylenchlorid bei 417 nm $19500 \frac{l}{molcm}$ und bei 381 nm $24400 \frac{l}{molcm}$. Die Absorptionsspektren von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal sind wenig vom Lösungsmittel abhängig, die Emissionsspektren zeigen mit zunehmend polarem Lösungsmittel eine Rotverschiebung. Diese Probe läßt so einen Rückschluß auf die Polarität seiner unmittelbaren Umgebung zu.

Die Wechselwirkung zwischen Solvens und Fluorophor kann mit Hilfe eines Lippert-Plots abgeschätzt werden. Das ist eine Auftragung der Orientierungspolarisierbarkeit der Lösungsmittel gegen den Stokes Shift ($\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F$ in cm^{-1}) des Fluorophors in diesen Lösungsmitteln.

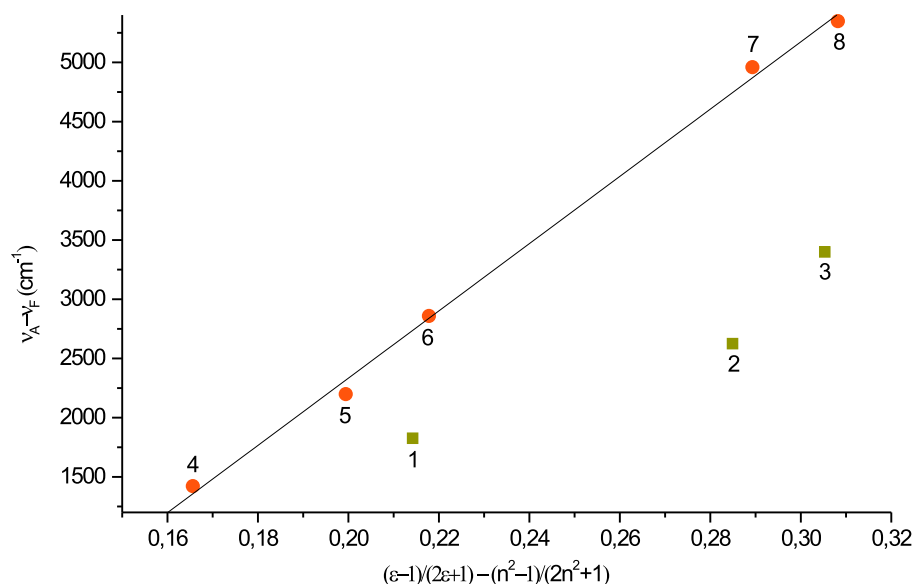


Abbildung 4.2: Lippert-Plot von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal: 1 THF, 2 Aceton, 3 Acetonitril, 4 Diethylether, 5 Ethylacetat, 6 Methylenchlorid, 7 Ethanol, 8 Methanol

Der Lippert-Plot von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal zeigt auf, daß der Stokes Shift in Lösungsmitteln, die Wasserstoffbrücken ausbilden (wie Ethanol und Methanol), größer ist als in Lö-

sungsmitteln, die weniger stark Wasserstoffbrücken ausbilden. Dieses Verhalten ist typisch für spezifische Solvens-Fluorophor Wechselwirkungen. Die Exzeß-Stokes-Verschiebungen in polaren Lösungsmitteln werden dem Vorhandensein einer negativen Ladung am Carbonylsauerstoffatom des Fluorophors zugeschrieben, welche Wasserstoffbrücken mit polaren Lösungsmitteln ausbildet.

Im Lippert-Plot liegen protische (Ethanol und Methanol) und nichtprotische Lösungsmittel (Diethylether, Ethylacetat und Methylenchlorid) auf einer Geraden. Das kann möglicherweise daran liegen, daß die Wechselwirkung des Fluorophors mit seiner Umgebung nicht alleine auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Carbonylgruppe mit protischen Solventien beruht, sondern auch auf einer spezifischen Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem Pyrenrest.

4.1.1.2 Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektren von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in verschiedenen Lösungsmitteln

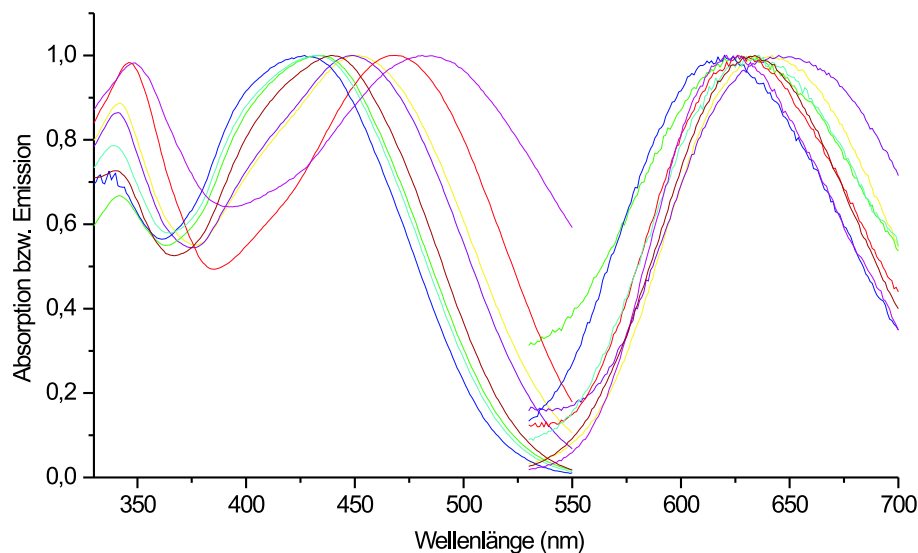


Abbildung 4.3: Absorptions- und Emissionsspektren von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in verschiedenen Lösungsmitteln. Anregungswellenlänge 480 nm, Normierung der Maxima der längstwelligsten Absorptionsbande und der Emissionsbande auf den Wert 1.0

Lösungsmittel	ϵ	n	Abs.-max (nm)	Em.-max (nm)	$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F (cm^{-1})$
Chloroform	4.80	1.444	485	621	4516
Methylenchlorid	9.0	1.424	469	626	5348
Ethanol	24.30	1.359	452	642	6548
Methanol	32.50	1.329	449	645	6768
DMSO	46.40	1.479	439	634	7006
DMF	37.24	1.431	433	626	7121
Aceton	20.70	1.357	429	620	7181
Acetonitril	35.94	1.342	432	636	7425

Tabelle 4.2: Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in verschiedenen Lösungsmitteln

Abbildung 4.3 zeigt auf der linken Seite (von 325 nm bis 550 nm) Absorptionsspektren von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in verschiedenen Lösungsmitteln. Auf der rechten Seite dieser Abbildung (von 530 nm bis 700 nm) sind Emissionsspektren dieses Fluorophors in verschiedenen Lösungsmitteln abgebildet. Die Absorptionskoeffizienten ϵ von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in Methylenchlorid betragen bei 469 nm $10500 \frac{l}{molcm}$ und bei 346 nm $10200 \frac{l}{molcm}$. Im Unterschied zum 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal zeigen die Absorptionsspektren des 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien eine starke Lösungsmittel-

abhängigkeit; dieser Farbstoff ist also solvatochrom. Die Emissionsspektren hingegen zeigen nur eine kleine Lösungsmittelabhängigkeit. Die Absorptionsspektren zeigen bei den polaren Lösungsmitteln Ethanol und Methanol jedoch nicht die stärkste Rotverschiebung, sondern bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen Methylenchlorid und ganz besonders Chloroform. Der Grund hierfür ist unbekannt. Beachtenswert ist der große Stokes Shift von ca. 200 nm in den meisten Lösungsmitteln. In Abbildung 4.3 ist zu sehen, daß das durchschnittliche Maximum der Absorption sich bei 430 nm befindet und das der Emission bei 630 nm.

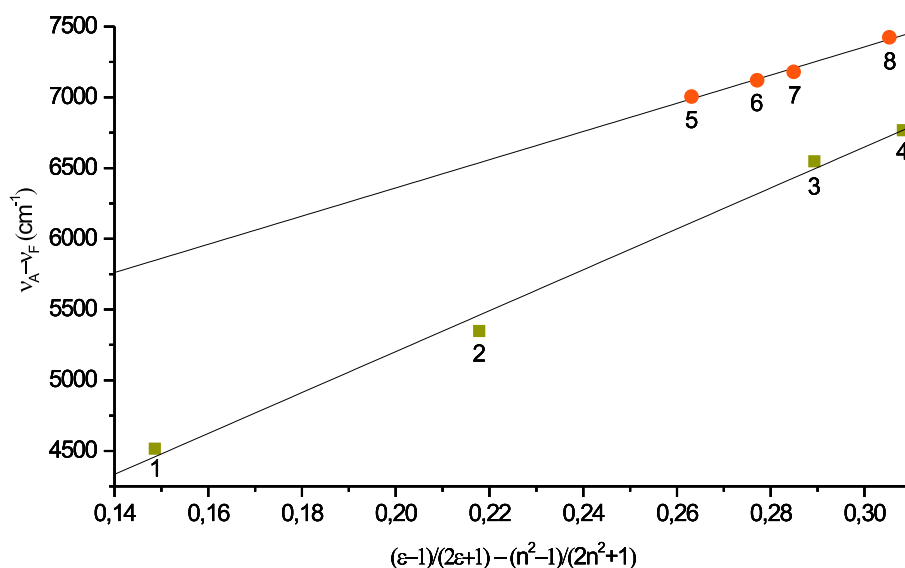


Abbildung 4.4: Lippert-Plot von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien: 1 Chloroform, 2 Methylenchlorid, 3 Ethanol, 4 Methanol, 5 DMSO, 6 DMF, 7 Aceton, 8 Acetonitril

Im Lippert-Plot für das 1-(1-Methyl-pyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien liegen die halogenierten Kohlenwasserstoffe Chloroform und Methylenchlorid gemeinsam mit Ethanol und Methanol auf einer Geraden. Dies deutet wiederum darauf hin, daß die Wechselwirkung dieses Fluorophors mit seiner Umgebung nicht alleine durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Sulfonsäuregruppe und dem Solvens erklärt werden kann. Dafür spricht auch, daß der Fluorophor nicht wasserlöslich ist. 1-(1-Methyl-pyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien zeigt als Besonderheit nicht nur in gelöstem Zustand eine Fluoreszenzerscheinung, sondern auch als Feststoff.

4.1.1.3 Aufnahme eines Absorptions- und Emissionsspektrums des Porphyrinfarbstoffs in wäßriger SDS-Lösung

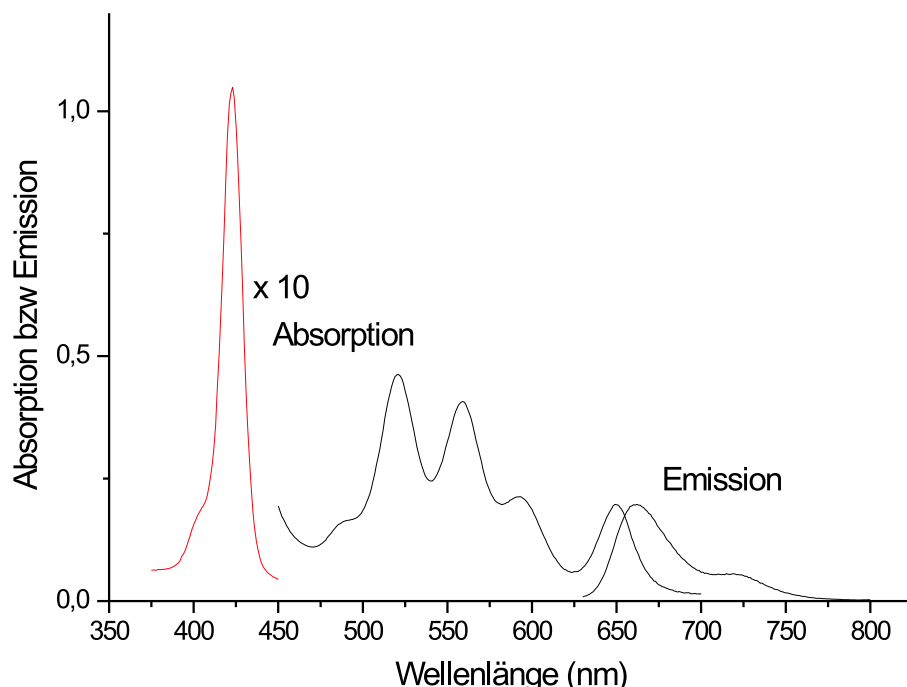


Abbildung 4.5: Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektrum des Porphyrinfarbstoffs in 0.22 mol/l SDS-Lösung

Abbildung 4.5 zeigt das Absorptions- (von 375 nm bis 700 nm) und das Emissionsspektrum (von 630 bis 800 nm) des Tetraphenylporphyrinderivates in wäßriger 0.22 molarer SDS-Lösung. Die sogenannte Soretbande, die ihr Maximum bei 423 nm hat, ist im Absorptionsspektrum zehnfach verkleinert dargestellt. Das Emissionsmaximum liegt bei 662 nm und ein Emissionsnebenmaximum liegt bei 719 nm. Das Tetraphenylporphyrinderivat ist in vielen organischen Lösungsmitteln löslich und zeigt in diesen Lösungsmitteln auch kaum veränderte Absorptions- und Emissionsspektren.

4.1.2 Messung der Fluoreszenzlebensdauer der synthetisierten Fluorophore in Tensidlösung

Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer wurde jeweils in einer Tensidlösung vorgenommen, die aus SDS, 1-Pentanol und Wasser bereitet wurde. Das Massenverhältnis von SDS zu Pentanol ist 1 zu 2, mit einem minimalen Wasseranteil, bis sich eine klare Lösung ergibt. Der Anteil von 1-Pentanol an dieser Lösung beträgt ca. 58.2 Massenprozent, von SDS ca. 29 Massenprozent und von Wasser ca. 12.8 Massenprozent. In diesen Lösungen ergibt sich für das 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal und das 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien eine einfach exponentielle Abklingdauer von 1060 ps bzw. 960 ps. Die gemessene Fluoreszenzlebensdauer von meso-Tetrakis(4-(2,5-dimethyl-1,4,7-trioxaoktanyl)phenyl)porphyrin beträgt in dieser Lösung 10.8 ns. Dieser Farbstoff zeigt

ebenfalls einfach exponentielles Abklingverhalten. Alle Fluorophore wurden in einem Konzentrationsbereich von 30 - 40 μmol vermessen. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. W. Holzer, Uni Regensburg, vorgenommen.

Weitere Fluoreszenzlebensdaueremessungen des Porphyrinderivates in mehreren Tensidlösungen wurde mit einem Time-Domain Fluorimeter der Arbeitsgruppe von Prof. Fidler, Universität Prag, durchgeführt. Alle Lösungen hatten eine Absorption von etwa 0.1 im Bereich der Soretbande des Porphyrins, also bei 420 nm. Als Lichtquelle wurde eine Laserdioden IBH Modell 07 mit einer Peakwellenlänge von 405 nm, einer Repetitionsrate von 1 MHz und einer Pulsdauer von kleiner 200 ps benutzt. Die Messung fand in einem Abklingzeitfenster von 100 ns statt, die maximale Peakhöhe betrug 2000 counts. Um den Anisotropieeffekt zu vermeiden, wurde mit vertikal polarisiertem Anregungslicht gearbeitet und die Emission unter dem magischen Winkel beobachtet. Anisotropieeffekt bedeutet das Auftreten einer zusätzlichen Komponente im Intensitätsabklingverhalten, die das Meßergebnis verfälscht. Ein Anisotropieeffekt kann auftreten, wenn die Rotationskorrelationszeit etwa gleich der Abklingzeit des Fluorophors ist und nicht unter einer Polfilteranordnung im magischen Winkel gemessen wird. Der Detektor war ein Hamamatsu Multichannelplate-Photomultiplier des Typs C4878-02. Alle Messungen der Intensitätsabklingdauer des Porphyrinderivates in den verschiedenen Tensidlösungen ergaben ein monoexponentielles Abklingverhalten. Wurden die Spektren nach einem biexponentiellen Abklingverhalten gefittet, so verschlechterte sich die Fitgüte verglichen mit einem monoexponentiellen Fit. Damit ist das Porphyrinderivat der erste Fluorophor, der monoexponentielles Abklingverhalten in Tensidlösung zeigt. Tabelle 4.3 faßt die Abklingzeiten des Fluorophors in den verschiedenen Tensidlösungen zusammen.

Tensidsystem	Konzentration [mol/l]	Abklingzeit [ns]	Abbildung
Natriumoctylsulfat	0.43	10.88	4.6
Natriumdecylsulfat	0.38	10.53	4.7
Natriumdodecylsulfat	0.22	9.13	4.8
Natriumdodecylsulfat	0.06	8.58	4.9
C ₁₂ TAB	0.22	10.18	4.10
C ₁₂ TAB, Hexanol	0.22, 0.11	10.40	4.11
SDS : TDMAO = 3 : 2	0.06	9.53	4.12
SDS : TDMAO = 7 : 3	0.06	9.22	4.13
SDS : TDMAO = 4 : 1	0.06	9.20	4.14
SDS : TDMAO = 9 : 1	0.06	8.92	4.15

Tabelle 4.3: Abklingzeiten des Porphyrinderivats in verschiedenen Tensidsystemen

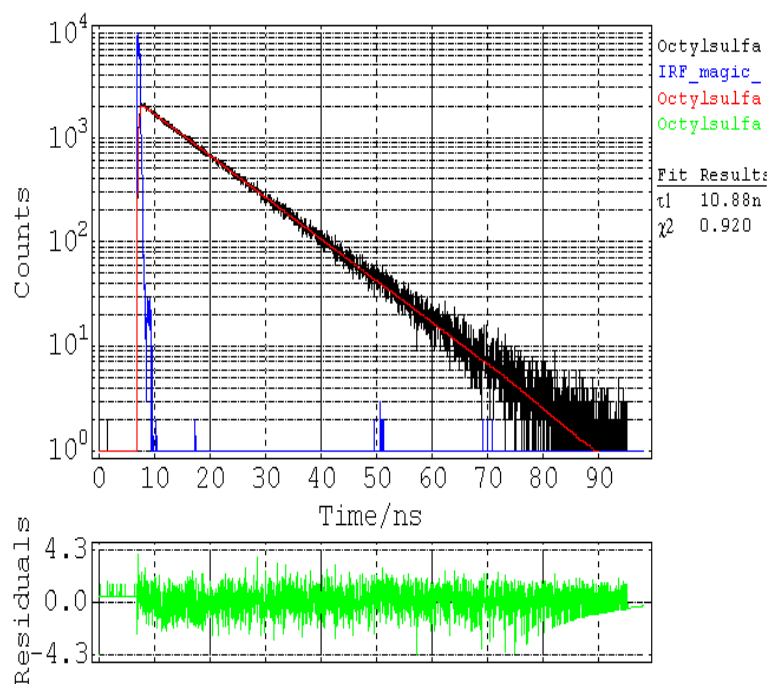


Abbildung 4.6: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.43 molarer Natriumoctylsulfatlösung

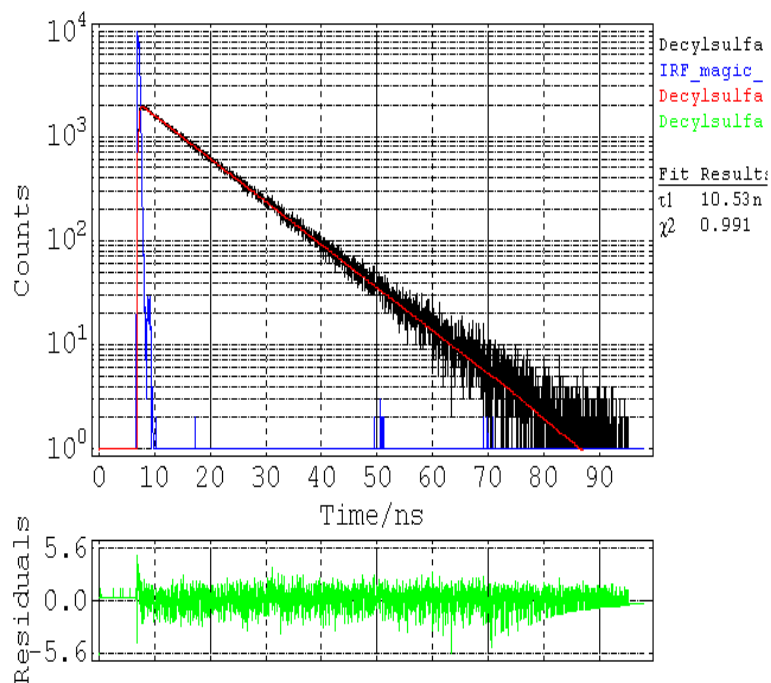


Abbildung 4.7: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.38 molarer Natriumdecylsulfatlösung

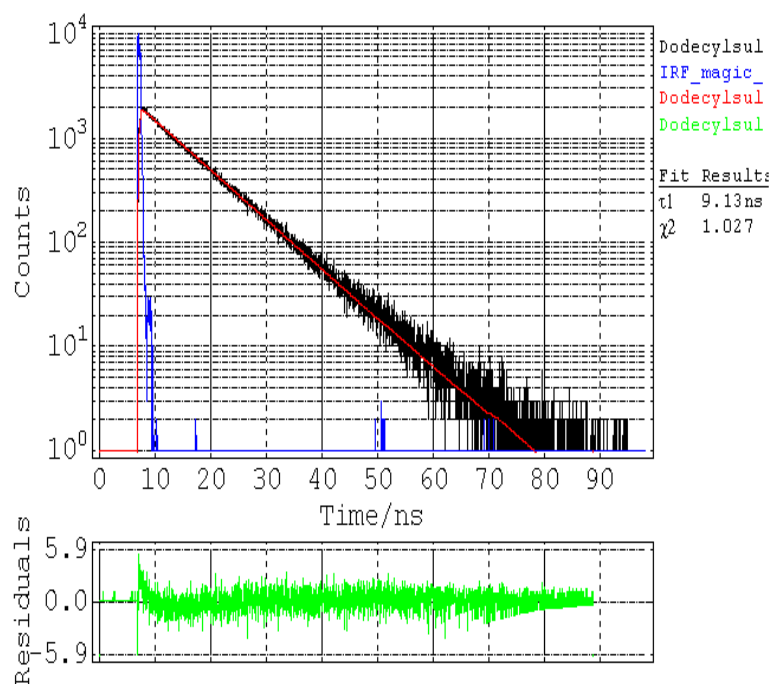


Abbildung 4.8: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.22 molarer Natriumdodecylsulfatlösung

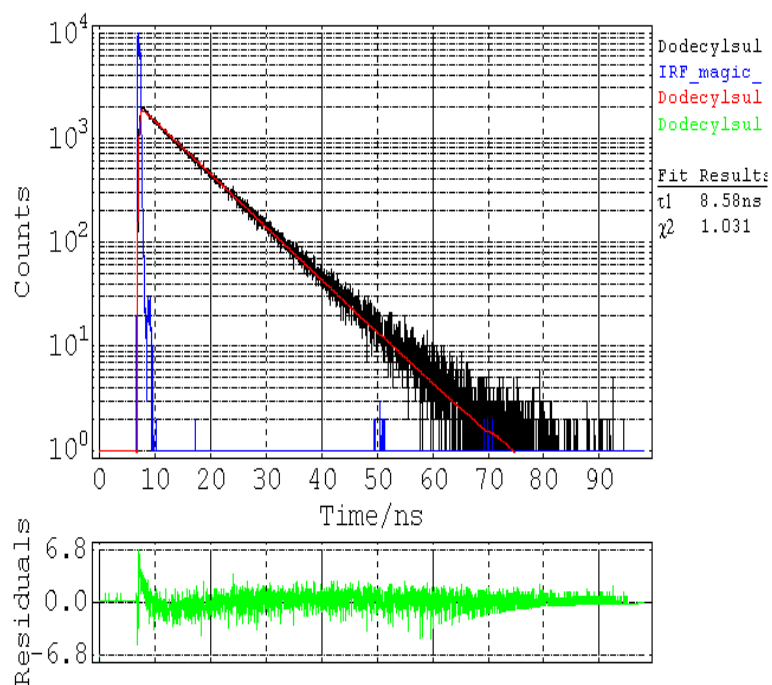


Abbildung 4.9: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer Natriumdodecylsulfatlösung

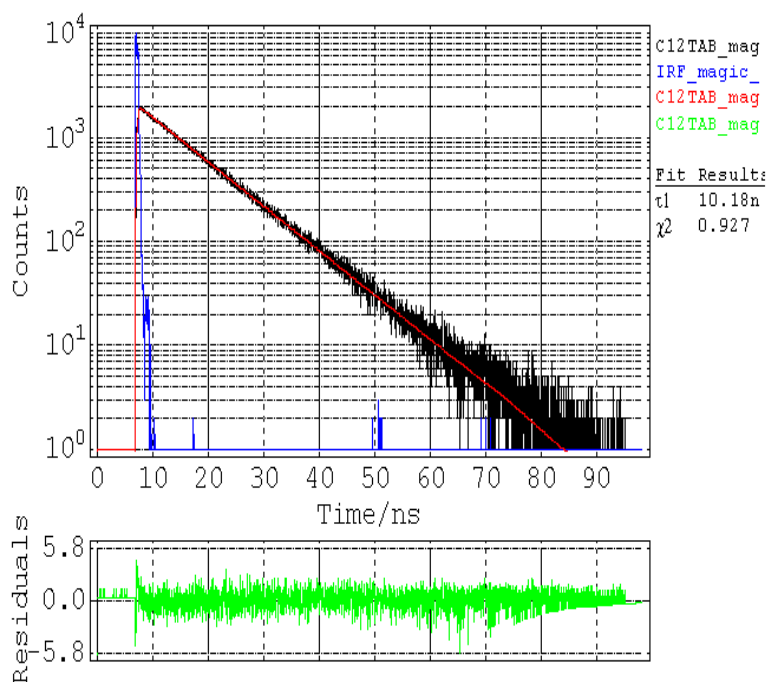


Abbildung 4.10: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.22 molarer C₁₂TAB-Lösung

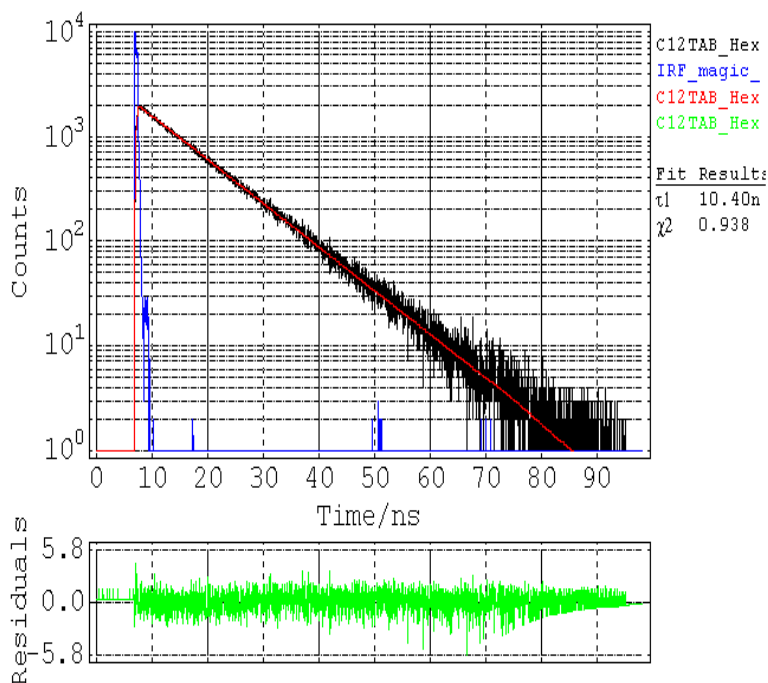


Abbildung 4.11: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.22 molarer C₁₂TAB-Lösung mit 0.11 molarem Hexanol

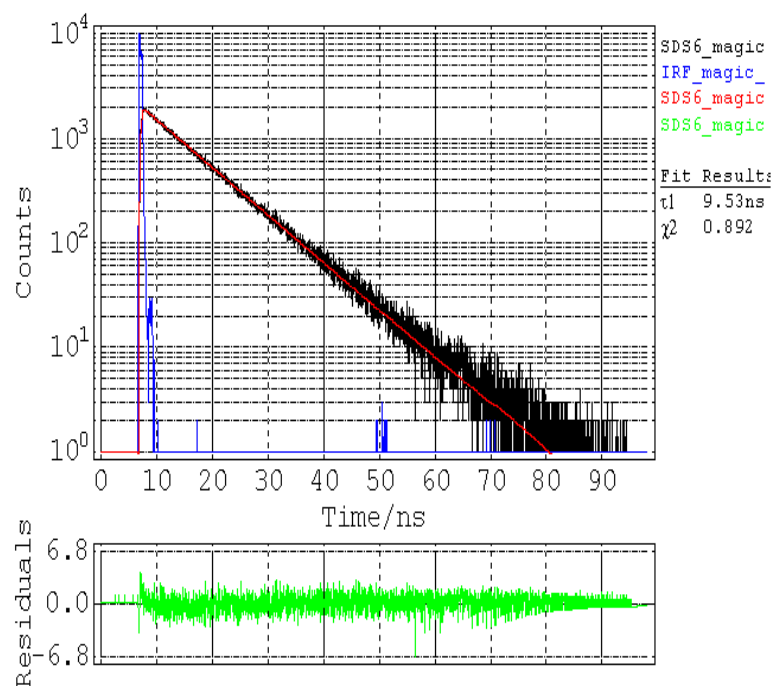


Abbildung 4.12: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 3:2

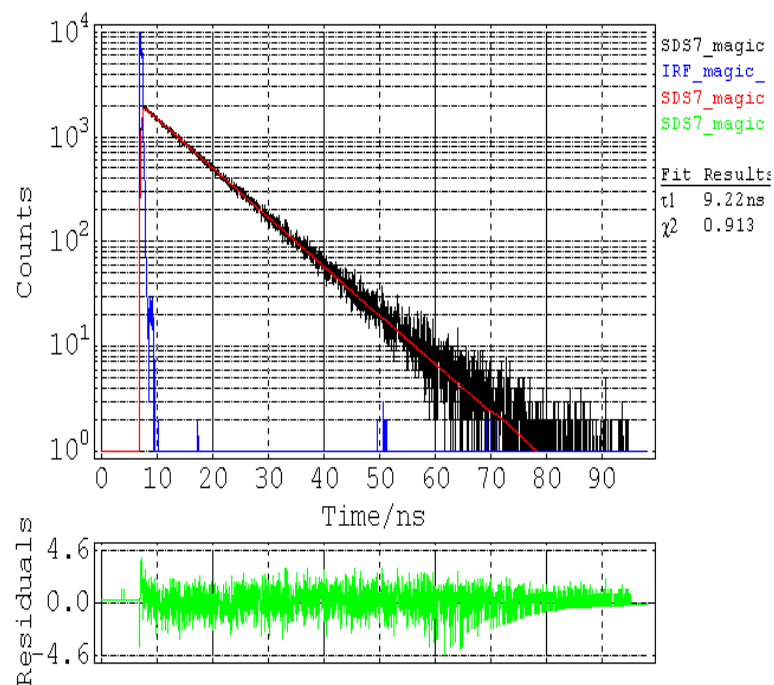


Abbildung 4.13: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 7:3

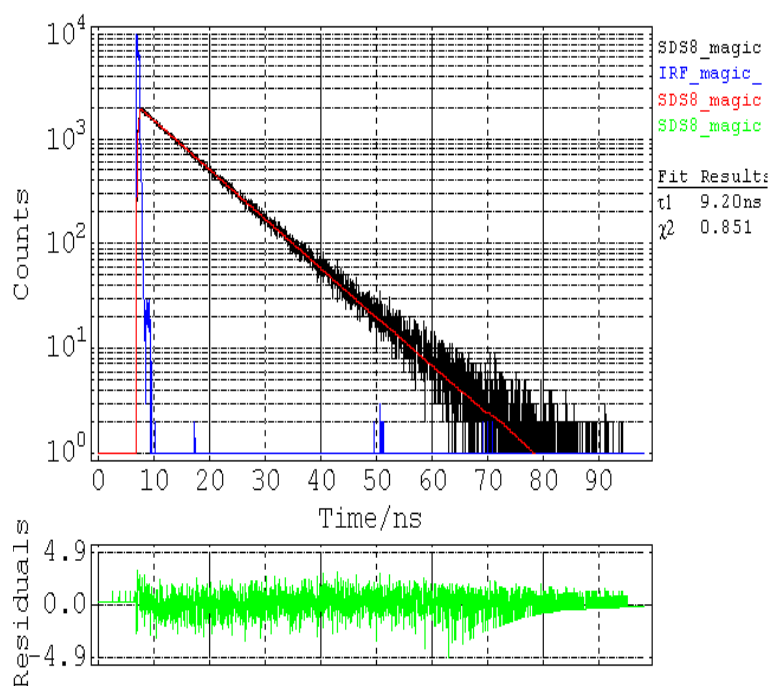


Abbildung 4.14: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 4:1

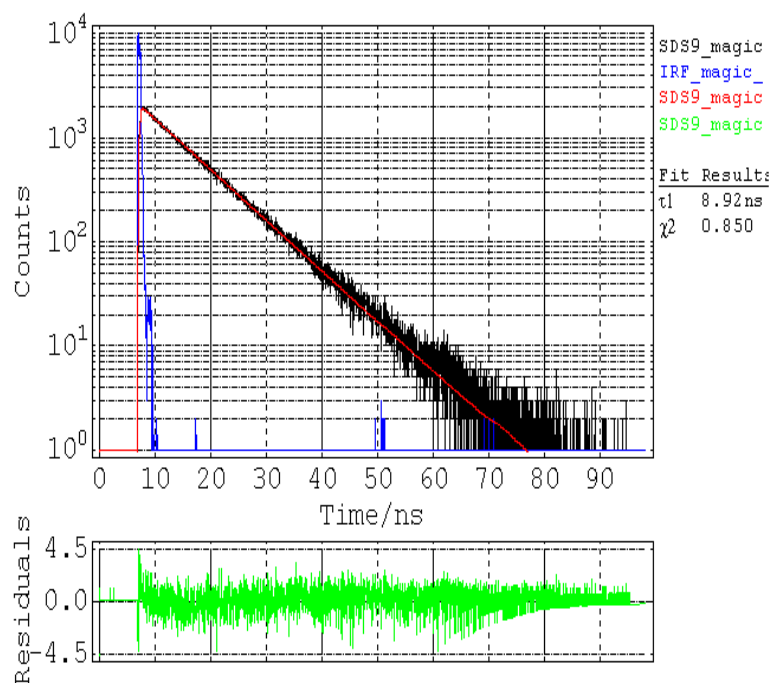


Abbildung 4.15: Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 9:1

4.1.3 Bestimmung eines Anregungsanisotropiespektrums des Porphyrinderivats

Eine Messung eines Anregungsanisotropiespektrums wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Fidler in Prag durchgeführt. Dieses Spektrum wird in Abbildung 4.16 gezeigt. Die Anregungslichtquelle war eine Xenon-Hochdrucklampe Xe 900 von Edinburgh Instruments, der Monochromator für das Anregungslicht war ein M 300 derselben Firma. Zum Abblocken von kurzwelligem Anregungslicht wurde zusätzlich ein 400 nm longpass cut-off Filter verwendet. Der Porphyrinfluorophor in Propylenglykol wurde bei einer Temperatur von -70°C mittels eines Kryoaufsatzes der Firma Oxford Optistat DN vermessen. Bei dieser Temperatur bildet Propylenglykol ein amorphes Glas. Die Emission wurde mit einem Monochromator Jobin Yvon Division Instruments, USA, bei 680 nm beobachtet. Als Detektor wurde ein Hamamatsu Multichannelplate-Photomultiplier C4878-02 verwendet. Zuvor wurde der G-Faktor dieser Fluorimeteranordnung bei der Emissionswellenlänge von 680 nm bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung von Cresyl Violett in Ethanol hergestellt. In dieser Lösung zeigt Cresyl Violett komplett depolarisierte Emission. Die Anregung erfolgte bei 600 nm und die Emission wurde zwischen 670 und 690 nm beobachtet, um den G-Faktor in diesem Bereich zu bestimmen. Die Rohdaten des Excitationsanisotropiespektrums befinden sich im Anhang in Tabelle 4.10.

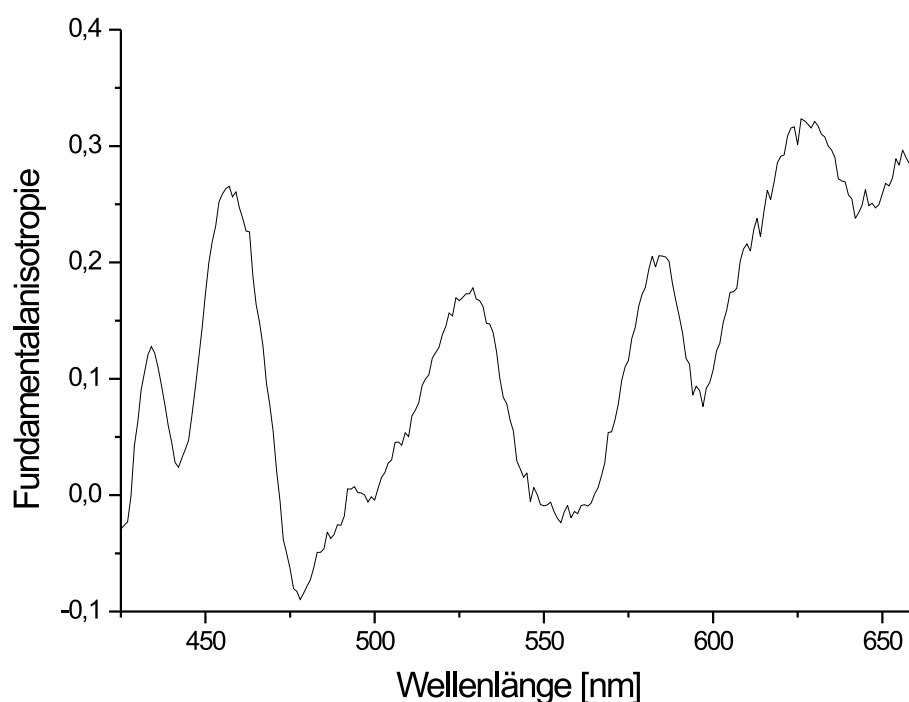


Abbildung 4.16: Aufnahme eines Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrinfluorophors in Propylenglykol bei -70°C

4.2 Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten

4.2.1 Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde im $C_{12}TAB$ / 1-Hexanol - System

Die FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde im $C_{12}TAB$ / 1-Hexanol - System wurden mit den festen Parametern Fundamentalanisotropie $r_0 = 0.32$ (siehe Abbildung 4.16) und einer Abklingzeit τ von 10.18 ns in 0.22 molarer $C_{12}TAB$ -Lösung (siehe Tabelle 4.3) bzw. von 10.40 ns in einer 0.22 molaren $C_{12}TAB$ -Lösung mit zugesetztem 0.11 molaren 1-Hexanol gefittet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.4. Für eine kugelförmige Mizelle ergibt sich bei einer Rotationskorrelationszeit von 5.65 ns (siehe Tabelle 4.4) unter Annahme einer Temperatur von 298 Kelvin und einer dynamischen Viskosität von Wasser von 0.890 cPoise ein Volumen von $2.61 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3$ und ein Mizellradius von 18.4 Angström (nach Gleichung 1.61 und mit Hilfe von $V_{\text{Kugel}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$). Der Radius für eine $C_{12}TAB$ -Mizelle, der mittels Neutronenstreuung gewonnen wurde, beträgt nach Tabelle 1.2 20.0 Angström. Ein weiterer Wert für den Mizellradius einer sphärischen $C_{12}TAB$ -Mizelle wurde durch eine NMR-Technik zu 21.1 Angström ermittelt. Der ermittelte Radius für den aliphatischen Kern dieser Mizelle wird zu 16.7 Angström angegeben und die Länge des Kopfbereichs zu 4.5 Angström [40]. Dieser fluorimetrisch ermittelte Wert des Mizellradius liegt nahe bei den Mizellradien, die durch Neutronenstreuung- und NMR-Experimente erhalten wurden. In der Literatur wurde noch kein Anisotropieabklingverhalten eines Fluorophors in Mizellen als monoexponentiell beschrieben, alle bislang bekannten Anisotropieabklingverhalten sind mindestens biexponentiell [2] oder multiexponentiell [3]. Ein monoexponentielles Abklingverhalten kann sich durch zwei Möglichkeiten ergeben: die Fluorophorprobe bewegt sich frei in der Mitte der Mizelle, ähnlich wie die Bewegung in einem Lösungsmittel. Dann würde sich aber eine wesentlich kürzere Rotationskorrelationszeit von ca. 0.5 ns ergeben, wie im Beispiel der Probe in Tetrahydrofuran. Die andere Möglichkeit ist, daß die Probe fest in der Mizelle verankert ist und die globale Rotationsbewegung der Mizelle mitmacht. Eine gemessene Rotationskorrelationszeit von 5.65 ns läßt diesen Schluß zu. Die Publikation von Matzinger et al. [3] gibt eine langsame Rotationskorrelationszeit $\tau_r^{(2)}$ für HANS in $C_{12}TAB$ Mizellen von 4.8 ns an und für DANS in diesen Mizellen von 3.6 ns. Damit sind diese experimentell ermittelten Rotationskorrelationszeiten deutlich schneller als die mit der Porphyrinsonde gemessene Korrelationszeit. Ihre Aminonaphthalinsulfonsäurefluorophore sind damit weniger fest an diese Mizellen gebunden und können die Gesamtbewegung der Mizelle schlechter wiedergeben als der Porphyrinfluorophor.

In den $C_{12}TAB$ -Systemen mit und ohne zugesetztem 1-Hexanol nimmt der Wert der Güte χ^2 nicht ab, sondern bleibt in etwa gleich, falls man von monoexponentiellem zu biexponentiellem Anisotropieabklingverhalten übergeht. Das bedeutet, daß das Vorhandensein von nicht-sphärischen Mizellen im $C_{12}TAB$ / 1-Hexanol System nicht sicher nachgewiesen werden kann. Die beiden nach einem biexponentiellem Anisotropieabklingverhalten gefitteten Rotationskorrelationszeiten für dieses System erscheinen plausibel. Nimmt man für dieses System an, daß die gebildeten Mizellen bei 298 K und einer dynamischen Viskosität des Lösungsmittels Wasser von 0.89 cPoise ein Volumen von $2.49 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3$ und ein Achsenverhältnis von 3.14 besitzen, so lassen sich die Rotationskorrelationszeiten für diesen prolaten Ellipsoid berechnen (siehe Gleichungen 1.67, 1.68, 1.69, 1.70, 1.71, 1.72). Sie betragen 9.61 ns, 5.22 ns und 13.35 ns. Die kurze und die lange Rotationskorrelationszeit stimmen dann mit den aus den Meßergebnissen gefitteten Rotationskorrelationszeiten

sehr gut überein. Das modellierte Achsenverhältnis von 3.14 stimmt in etwa mit dem Wert von 2.65 (aus Tabelle 1.2 errechnet) überein. Überraschend ist der Befund, daß das Volumen einer C₁₂TAB / 1-Hexanol - Mizelle etwas kleiner modelliert wird als eine reine C₁₂TAB-Mizelle, siehe Tabelle 4.5.

$\frac{c_{C_{12}TAB}}{\text{mol/l}}$	$\frac{c_{Hexanol}}{\text{mol/l}}$	Fit	$\frac{\tau}{\text{ns}}$	r_0	$\frac{\Theta_1}{\text{ns}}$	$\frac{\Theta_2}{\text{ns}}$	g_2	χ^2	Tabelle
0.22	0	1 Θ	10.18	0.320	5.65			0.156	4.21
0.22	0.11	1 Θ	10.40	0.320	5.675			0.545	4.22
0.22	0.11	2 Θ	10.40	0.320	13.34	5.23	0.919	0.463	4.22

Tabelle 4.4: Auswertung der Anisotropiemessdaten für das System C₁₂TAB / 1-Hexanol. g_2 ist der Anteil an den Amplituden der einzelnen Komponenten der Anisotropie mit $g_1 + g_2 = 1$, wie in Gleichung 1.32 definiert.

$\frac{c_{C_{12}TAB}}{\text{mol/l}}$	$\frac{c_{Hexanol}}{\text{mol/l}}$	$\frac{\text{Volumen}}{\text{Angstrom}^3}$	$\frac{r_1}{\text{Angstrom}}$	$\frac{r_2}{\text{Angstrom}}$
0.22	0	26100	18.4	18.4
0.22	0.11	24900	12.4	38.8

Tabelle 4.5: Modellierung der Mizellen des Systems C₁₂TAB / 1-Hexanol

4.2.2 Auswertung der FD-Anisotropiemessdaten der Porphyrinsonde in Natriumoctylsulfat, -decylsulfat und -dodecylsulfat

Die Meßergebnisse für diese drei Tenside werden am besten durch jeweils monoexponentielles Anisotropieabklingverhalten der Porphyrinsonde beschrieben. Damit haben diese Mizellen Kugelform. Die Fitergebnisse sind in der Tabelle 4.6 zusammengefaßt.

Tensid	$\frac{c_{Tensid}}{\text{mol/l}}$	Fit	$\frac{\tau}{\text{ns}}$	r_0	$\frac{\Theta}{\text{ns}}$	χ^2	Tabelle	$\frac{\text{Volumen}}{\text{Angstrom}^3}$	$\frac{\text{Radius}}{\text{Angstrom}}$
NaOS	0.43	1 Θ	10.88	0.320	4.01	0.621	4.23	18500	16.4
NaDS	0.38	1 Θ	10.53	0.320	4.60	0.385	4.24	21300	17.2
SDS	0.22	1 Θ	9.13	0.320	5.66	0.326	4.25	26200	18.4

Tabelle 4.6: Auswertung der Anisotropiemessdaten für Natriumoctylsulfat, -decylsulfat und -dodecylsulfat

Für Natriumoctylsulfatmizellen ergibt sich eine Rotationskorrelationszeit von 4.01 ns. Unter Annahme der Parameter Temperatur gleich 298 Kelvin und dynamischer Viskosität von Wasser gleich 0.890 cPoise ergibt sich ein Mizellvolumen von $1.85 \cdot 10^{-26} \text{m}^3$ und ein Mizellradius von 16.4 Angström. Bei Decylsulfatmizellen wurde eine mittlere Korrelationszeit von 4.60 ns gemessen. Es ergibt sich ein Mizellvolumen von $2.13 \cdot 10^{-26} \text{m}^3$ und ein Mizellradius von 17.2 Angström. Die mittlere Rotationskorrelationszeit einer Natriumdodecylmizelle wurde zu 5.66 ns bestimmt. Diese Mizellen haben ein Volumen von $2.62 \cdot 10^{-26} \text{m}^3$ und einen Radius von 18.4 Angström. Damit sind Natriumdodecylmizellen

und Dodecyltrimethylammoniumbromidmizellen gleich groß. Nimmt man an, daß der Mizellradius sich aus der Länge einer Kopfgruppe und der Länge einer gestreckten Alkylkette ergibt, so lassen sich Mizellradien berechnen. Für die Länge einer Alkylkette nimmt man nach der Tanford-Gleichung an [39]:

$$l_{max} = 1.5 + 1.265 \cdot n_c \quad (4.1)$$

Dabei bedeutet l_{max} die Länge der Kette in Angström und n_c die Zahl der Kohlenstoffatome in der Kette minus eins. Für Octylkohlenwasserstoffkette ergibt sich l_{max} zu 10.4 Angström, für eine Decylkette zu 12.9 Angström und für eine Dodecylkette zu 15.5 Angström. Addiert man zu diesen Kettenlängen noch die Länge einer Sulfatkopfgruppe, die 4.7 Angström beträgt (nach Literaturstelle [20]), so erhält man für das Octylsulfat 15.1 Angström, für das Decylsulfat 17.6 Angström und für das Dodecylsulfat 20.2 Angström. Man sieht, daß die gemessenen Mizellradien in der Nähe der theoretischen Mizellradien liegen.

4.2.3 Publierte Daten über Radien von Natriumalkylsulfat- und Alkyltrimethylammoniumbromidmizellen

Israelachvili [46] gibt den Radius einer SDS-Mizelle zu 17 Angström an. Bockstahl et al. [47] haben den Radius von SDS-Mizellen bei 294 Kelvin in 0.28 molarer SDS-Lösung durch „positron annihilation lifetime“ Spektroskopie bestimmt. Ihre Meßdaten wurden nach zwei unterschiedlichen Hypothesen ausgewertet und ergaben einen hydrophoben Coreradius von 18.8 und 19.0 ± 0.3 Angström, sowie nach der anderen Hypothese einen Radius von 16.9 und 17.2 ± 0.3 Angström.

Bergström et al. [48] bestimmten den Radius von SDS- und C₁₂TAB-Mizellen bei 40°C in wäßriger Tensidlösung mit oder ohne zugefügtes Natriumbromid durch SANS-Experimente. In reinem D₂O ergeben sich bei beiden Tensiden scheibenförmige Mizellen. Der kurze Radius erhöht sich von 8.9 Angström bei einer 0.25 %igen SDS-Lösung auf 12.0 Angström bei einer 1 %igen Lösung. Der lange Radius erhöht sich nur geringfügig von 19.9 auf 20.3 Angström. In 0.5 %iger C₁₂TAB-Lösung liegt der kurze Radius bei 8.7 Angström und erhöht sich bei einer 1 %igen Lösung auf 12.3 Angström. Der lange Radius erniedrigt sich leicht von 21.7 auf 21.4 Angström.

Vass et al. [49, 50] untersuchten mit SANS-Experimenten den Radius von Natriumdecyl- und -dodecylsulfatmizellen. Ihre Ergebnisse als Coreradius für das Decylsulfat sind 12.6 und 13.1 ± 0.3 Angström und 15.7 ± 0.3 Angström als Coreradius des Dodecylsulfats.

Missel et al. [51] haben mit quasielastischer Lichtstreuung die Mizellradien von Natriumoctyl-, -decyl- und -dodecylsulfat in 0.1 molarer Natriumchloridlösung bestimmt. Sie erhielten 15.53 ± 0.19 Angström für Natriumoctylsulfat, 19.82 ± 0.06 Angström für Natriumdecylsulfat und 25.20 ± 0.07 Angström für Natriumdodecylsulfat.

Berr et al. [52] bestimmten den Coreradius von C₁₂TAB-Mizellen mit SANS-Messungen zu 13.1 Angström und die Länge des Sternbereich dieser Mizellen zu 9 Angström. Es ergibt sich so ein Mizellradius von 22.1 Angström.

Diese publizierten Meßdaten zeigen, daß gemessene Mizellradien eines Tensids durchaus unterschiedlich sein können. Bedingt durch die Meßmethode, die im Fall von SANS-Messungen nur den Corebereich erfassen, oder durch unterschiedliche Parameter wie Temperatur oder Salzgehalt der Lösung ergeben sich beim gleichen Tensid unterschiedliche

Resultate. Die durch Anisotropiemessungen der Porphyrinprobe gewonnenen Mizellradien sind etwas kleiner als der Durchschnitt der publizierten Mizellradien des gleichen Tensids.

4.2.4 Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde in Tetrahydrofuran

Das Anisotropieabklingverhalten der Sonde in Tetrahydrofuran ist monoexponentiell. Gibt man die Fundamentalanisotropie zu 0.32 vor, so wird die Intensitätsabklingdauer zu 5.96 ns und die Rotationskorrelationszeit zu 0.567 ns gefittet. Der Wert für χ^2 beträgt 0.040. Die deutlich verkürzte Abklingdauer von etwa 6 ns verglichen mit ca. 10.5 ns in Mizellen deutet darauf hin, daß die Fluorophore in Tetrahydrofuran aggregieren und es so zu einer teilweisen Fluoreszenzselbstlöschung kommt. Fittet man die Meßergebnisse nach einem biexponentiellen Anisotropieabklingverhalten so werden die χ^2 Werte wieder größer. Mit dieser Messung zeigt sich, daß der freie Fluorophor eine sehr kurze Rotationskorrelationszeit von einer halben Nanosekunde hat. Daraus läßt sich schließen, daß der Fluorophor in Lösungsmitteln frei beweglich ist. Dagegen liegt er in Mizellen an das Aggregat gebunden vor.

4.2.5 Auswertung der FD-Anisotropiemeßdaten der Porphyrinsonde im System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid

Die nachfolgende Tabelle 4.7 gibt die Ergebnisse eines Fits der FD-Anisotropiemeßdaten der Sonde im System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid an. 60 millimolare Lösungen von SDS und TDMAO wurden dabei im angegebenen Verhältnis gemischt. Für die reine SDS-Lösung ergibt sich bei dieser Konzentration eine Rotationskorrelationszeit von 5.625 ns, welche vergleichbar ist mit der bei der 0.22 molaren Konzentration gemessenen von 5.65 ns.

Beim Mischungsverhältnis SDS : TDMAO von 9 : 1 und 8 : 2 lassen sich die Meßergebnisse nicht nach einem biexponentiellem Abklingverhalten fitten. Bei einem Mischungsverhältnis von SDS : TDMAO von 7 : 3 und 6 : 4 lassen sich die Meßergebnisse nach einem biexponentiellem Abklingverhalten fitten, jedoch erniedrigt sich erstmals beim Mischungsverhältnis von 6 : 4 der Wert von χ^2 um mehr als die Hälfte verglichen mit dem χ^2 -Wert eines monoexponentiellen Anisotropiefits. Daher kann erst sicher von nichtsphärischen Mizellen ab dem Mischungsverhältnis von 6 : 4 und kleiner gesprochen werden.

Bei einem Mischungsverhältnis von 7 : 3 lassen sich die erhaltenen beiden Rotationskorrelationszeiten von 46.32 und 7.60 ns durch einen prolaten Ellipsoid erklären, der ein Volumen von $3.57 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3$ und ein Achsenverhältnis von 6.0 aufweist. Für diesen Ellipsoid lassen sich 3 Rotationskorrelationszeiten berechnen, die die Werte 7.64, 20.51 und 46.84 ns haben. Vergleicht man das Achsenverhältnis von 6.0 mit dem aus den publizierten Daten errechneten von 2.25 aus Tabelle 1.3, so ergibt sich ein deutlicher Unterschied.

Bei einem Mischungsverhältnis von 6 : 4 lassen sich die erhaltenen beiden Rotationskorrelationszeiten von 51.62 und 7.89 ns durch einen prolaten Ellipsoid erklären, der ein Volumen von $3.69 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3$ und ein Achsenverhältnis von 6.3 aufweist. Für diesen Ellipsoid lassen sich 3 Rotationskorrelationszeiten berechnen, die die Werte 7.89, 21.70 und 52.03 ns haben.

Bei einem Mischungsverhältnis von 5 : 5 lassen sich die erhaltenen beiden Rotationskorrelationszeiten von 14.71 und 8.89 ns durch einen prolaten Ellipsoid erklären, der ein Volumen von $4.32 \cdot 10^{-26} m^3$ und ein Achsenverhältnis von 2.1 aufweist. Für diesen Ellipsoid lassen sich 3 Rotationskorrelationszeiten berechnen, die die Werte 8.93, 12.67 und 14.74 ns haben. Vergleicht man das Achsenverhältnis von 2.1 mit dem aus den publizierten Daten errechneten von 3.44 aus Tabelle 1.3, so ergibt sich wiederum ein Unterschied.

Bei einem Mischungsverhältnis von 4 : 6 lassen sich die erhaltenen beiden Rotationskorrelationszeiten von 13.45 und 8.09 ns durch einen prolaten Ellipsoid erklären, der ein Volumen von $3.90 \cdot 10^{-26} m^3$ und ein Achsenverhältnis von 2.12 aufweist. Für diesen Ellipsoid lassen sich 3 Rotationskorrelationszeiten berechnen, die die Werte 8.07, 11.53 und 13.44 ns haben. Vergleicht man das Achsenverhältnis von 2.12 mit dem aus den publizierten Daten errechneten von 3.44 aus Tabelle 1.3, so ergibt sich ein Unterschied.

Bei einem Mischungsverhältnis von 3 : 7 lassen sich die erhaltenen beiden Rotationskorrelationszeiten von 13.51 und 7.71 ns durch einen prolaten Ellipsoid erklären, der ein Volumen von $3.74 \cdot 10^{-26} m^3$ und ein Achsenverhältnis von 2.23 aufweist. Für diesen Ellipsoid lassen sich 3 Rotationskorrelationszeiten berechnen, die die Werte 7.74, 11.40 und 13.54 ns haben. Das von den publizierten Daten errechnete Achsenverhältnisses von 3.52 ist wiederum verschieden vom modellierten Wert von 2.23.

Die erhaltenen Unterschiede lassen sich möglicherweise dadurch erklären, daß bei den modellierten Ellipsoiden ein Modell für einen prolaten Ellipsoid zugrunde gelegt wurde, bei der Publikation von [20] jedoch ein allgemeiner Ellipsoid mit drei verschiedenen Achsen.

Bei den Mischungsverhältnissen von 2 : 8 und 1 : 9 treten bei einem gefitteten biexponentiellen Anisotropiezerfall jeweils Komponenten mit kurzer Abklingzeit (ca. 3.2 bis 3.6 ns) auf, die einen geringen Anteil am Gesamtanisotropieabklingverhalten haben. Das kann bedeuten, daß der Fluorophor bereits eine geringe Eigenbewegung innerhalb dieser Mizellen hat.

Alle modellierten Größen für das System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid sind in Tabelle 4.8 zusammengefaßt.

SDS : TDMAO	Fit	$\frac{\tau}{ns}$	r_0	$\frac{\Theta_1}{ns}$	$\frac{\Theta_2}{ns}$	g_2	χ^2	Tabelle
10:0	1 Θ	8.58	0.320	5.625			0.219	4.11
9:1	1 Θ	8.92	0.320	5.647			0.458	4.12
8:2	1 Θ	9.20	0.320	6.684			0.271	4.13
7:3	1 Θ	9.22	0.320	7.698			0.265	4.14
7:3	2 Θ	9.22	0.320	46.32	7.60	0.992	0.281	4.14
6:4	1 Θ	9.53	0.320	8.914			1.132	4.15
6:4	2 Θ	9.53	0.320	51.62	7.89	0.916	0.549	4.15
5:5	1 Θ	9.19	0.320	9.280			0.401	4.16
5:5	2 Θ	9.19	0.320	14.71	8.89	0.917	0.448	4.16
4:6	1 Θ	9.06	0.320	9.654			0.358	4.17
4:6	2 Θ	9.06	0.320	13.45	8.09	0.662	0.771	4.17
3:7	1 Θ	8.44	0.320	8.370			1.083	4.18
3:7	2 Θ	8.44	0.320	13.51	7.71	0.852	1.094	4.18
2:8	1 Θ	7.74	0.320	6.375			3.637	4.19
2:8	2 Θ	7.74	0.320	6.58	3.19	0.0123	5.765	4.19
1:9	1 Θ	9.51	0.320	10.975			0.391	4.20
1:9	2 Θ	9.51	0.320	11.23	3.57	0.021	0.391	4.20

Tabelle 4.7: Auswertung der Anisotropiemeßdaten für das System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid

SDS : TDMAO	$\frac{Volumen}{Angstrom^3}$	$\frac{r_1}{Angstrom}$	$\frac{r_2}{Angstrom}$
10:0	26000	18.37	18.37
9:1	26100	18.40	18.40
8:2	30900	19.46	19.46
7:3	35700	11.24	67.44
6:4	36900	11.18	70.45
5:5	43200	17.00	35.70
4:6	39000	16.38	34.72
3:7	37400	15.88	35.41

Tabelle 4.8: Modellierung der Mizellen für das System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Modellierung verschiedener Mizellen, deren Größe und Form bereits publiziert sind. Diese Aufgabe wurde mit Hilfe eines selbstgebauten FD-Fluorimeters bewältigt, der das Anisotropieabklingverhalten einer neu synthetisierten Fluorophorprobe mißt. Die erhaltenen Anisotropiemeßdaten wurden nach einem mono- oder biexponentiellem Abklingverhalten gefittet, wobei die dazu benötigten Parameter Intensitätsabklingzeit und Fundamentalanisotropie des Fluorophors separat ermittelt wurden. Es stellte sich heraus, daß dieser Fluorophor in allen mizellaren Lösungen monoexponentielles Intensitätsabklingverhalten zeigt und damit innerhalb der Mizellen nur eine einzige fluoreszierende Spezies vorliegt. Weiterhin zeigte der Fluorophor in reinen SDS-, C₁₂TAB-, Natriumoctylsulfat-, und Natriumdecylsulfatmizellen ein monoexponentielles Anisotropieabklingverhalten. Die erhaltenen jeweiligen Rotationskorrelationszeiten erlaubten es, das Volumen und den Radius dieser Mizellen nach der Stokes-Einstein-Gleichung zu bestimmen. Diese Werte stimmen sehr gut mit publizierten Werten überein. Messungen der Rotationskorrelationszeit des Fluorophors in Tetrahydrofuran zeigten, daß diese im Bereich einer halben Nanosekunde lagen und damit ca. ein Zehntel der Rotationskorrelationszeit in Mizellen betragen. Daraus konnte geschlossen werden, daß der Fluorophor in Mizellen fest an das Mizellaggregat gebunden ist. Prolate Mizellen konnten ebenfalls modelliert werden, hier ist jedoch die Übereinstimmung mit den Literaturdaten weniger gut. Am besten gelang dies am Beispiel von C₁₂TAB-1-Hexanol-Mizellen, deren Achsenverhältnis zu 3.14 modelliert wurde verglichen mit einem Wert von 2.65 aus einer Auswertung von Kleinwinkelneutronenstreuungsmessungen. Die Ergebnisse im SDS-TDMAO-System stimmten am wenigsten mit den Literaturdaten überein. Dies könnte vielleicht daran liegen, daß diese Methode eine Mindestgröße eines Achsenverhältnisses braucht, um den Unterschied zwischen einer sphärischen und einer prolaten Mizelle zu detektieren. Ist jedoch dieses Achsenverhältnis groß, so entwickelt der Fluorophor eine Eigenrotation und kann somit die globale Rotation dieses Typs von Mizellen nicht mehr sondieren. Eine andere Möglichkeit ist, daß die Mizellen nach einem prolaten Ellipsoid modelliert wurden, die publizierten Daten im SDS-TDMAO-System jedoch von einem allgemeinen Ellipsoid ausgehen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die entwickelte Methode, die auf der Messung des Anisotropieabklingverhaltens einer in Mizellen eingebrachten Fluorophorprobe beruht, eine kostengünstig und schnell durchführbare Alternative zu etablierten Methoden darstellt.

Anhang

Die ersten beiden Tabellen geben die Rohdaten des Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrinfluorophors in Propylenglykol an. Die erste Spalte gibt die Wellenlänge in nm und die zweite Spalte den Fundamentalanisotropiewert bei dieser Wellenlänge an.

Die nachfolgenden 10 Tabellen geben jeweils Anisotropiemessdaten für den Fluorophor im System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid wieder, beginnend bei 10 Volumenanteilen SDS und 0 Volumenanteilen Tetradecyldimethylaminoxid bis zu 1 Volumenanteil SDS und 9 Volumenanteilen Tetradecyldimethylaminoxid. Die Gesamtkonzentration aller Tenside liegt bei 60 mmol/l.

Danach folgen 2 Tabellen, die die Meßdaten für den Fluorophor in einer 0.22 molaren wäßrigen C₁₂TAB-Lösung und in einer 0.22 molaren wäßrigen C₁₂TAB-Lösung mit zuge-setztem 0.11 mol/l 1-Hexanol angeben.

Die sich daran anschließenden 3 Tabellen geben die Meßergebnisse für den Fluorophor in einer 0.43 molaren Natriumoctylsulfatlösung, in einer 0.38 molaren Natriumdecylsulfatlösung und in einer 0.22 molaren SDS-Lösung an.

Die letzte Tabelle gibt die Meßergebnisse einer Messung des Fluorophors in THF an. Für alle Tabellen gilt, daß die erste Spalte jeweils die Meßfrequenz in MHz angibt, die zweite Spalte den Phasenshift in Grad, die dritte Spalte die Modulation, die vierte Spalte die Standardabweichung des Phasenshifts und die fünfte Spalte die Standardabweichung der Modulation.

425	-0.02922	466	0.14817	507	0.04577
426	-0.02567	467	0.12783	508	0.043
427	-0.02314	468	0.09605	509	0.05353
428	-0.00053	469	0.0781	510	0.05034
429	0.04292	470	0.05473	511	0.06803
430	0.0633	471	0.02102	512	0.07293
431	0.09018	472	-0.00486	513	0.07929
432	0.10566	473	-0.03792	514	0.09438
433	0.12074	474	-0.05015	515	0.09976
434	0.12774	475	-0.06333	516	0.10342
435	0.12227	476	-0.08037	517	0.1177
436	0.10964	477	-0.08259	518	0.12234
437	0.09402	478	-0.08974	519	0.12692
438	0.07749	479	-0.08421	520	0.13802
439	0.05982	480	-0.07828	521	0.145
440	0.04563	481	-0.07267	522	0.1566
441	0.02803	482	-0.06232	523	0.15407
442	0.02389	483	-0.0492	524	0.16968
443	0.03166	484	-0.04915	525	0.1672
444	0.03904	485	-0.04617	526	0.16985
445	0.04716	486	-0.0316	527	0.17308
446	0.06825	487	-0.03729	528	0.17303
447	0.09213	488	-0.03377	529	0.17819
448	0.11786	489	-0.02545	530	0.16861
449	0.14408	490	-0.02583	531	0.16713
450	0.17293	491	-0.01794	532	0.1621
451	0.19976	492	0.00536	533	0.14772
452	0.21816	493	0.00518	534	0.14716
453	0.23142	494	0.00723	535	0.13967
454	0.25205	495	0.00214	536	0.12317
455	0.25876	496	0.00192	537	0.10035
456	0.26344	497	0.00023	538	0.08413
457	0.2655	498	-0.00587	539	0.07875
458	0.2563	499	-0.00134	540	0.06452
459	0.26059	500	-0.00428	541	0.05516
460	0.24704	501	0.00596	542	0.02941
461	0.23769	502	0.01529	543	0.02259
462	0.227	503	0.01922	544	0.01532
463	0.2263	504	0.02768	545	0.01924
464	0.1879	505	0.0303	546	-0.00549
465	0.16363	506	0.0453	547	0.00665

Tabelle 4.9: erster Teil der Rohdaten des Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrinfarbstoffes in Propylenglykol

548	0.00051	589	0.16668	630	0.32116
549	-0.00811	590	0.15388	631	0.31739
550	-0.00924	591	0.13901	632	0.31028
551	-0.00836	592	0.11756	633	0.30796
552	-0.00597	593	0.11261	634	0.30007
553	-0.01412	594	0.08602	635	0.29654
554	-0.01994	595	0.09362	636	0.2902
555	-0.0237	596	0.08995	637	0.27201
556	-0.01461	597	0.07615	638	0.26999
557	-0.00874	598	0.09185	639	0.2693
558	-0.0194	599	0.09679	640	0.25805
559	-0.01406	600	0.10763	641	0.2546
560	-0.01591	601	0.12418	642	0.23787
561	-0.00887	602	0.13045	643	0.24247
562	-0.00813	603	0.14855	644	0.24875
563	-0.00936	604	0.15891	645	0.2626
564	-0.00666	605	0.17443	646	0.24879
565	0.00109	606	0.1747	647	0.25094
566	0.00662	607	0.17785	648	0.24687
567	0.01666	608	0.20114	649	0.24969
568	0.02772	609	0.21158	650	0.25919
569	0.05378	610	0.21599	651	0.26801
570	0.05442	611	0.20979	652	0.26573
571	0.06425	612	0.22812	653	0.27274
572	0.07833	613	0.23787	654	0.28924
573	0.09875	614	0.22215	655	0.28363
574	0.11049	615	0.24348	656	0.29675
575	0.11575	616	0.26206	657	0.29014
576	0.13486	617	0.25397	658	0.28481
577	0.14431	618	0.26866	659	0.27967
578	0.16229	619	0.28575	660	0.28978
579	0.17227	620	0.29126	661	0.30263
580	0.17862	621	0.2925	662	0.28544
581	0.19412	622	0.30862	663	0.27946
582	0.20543	623	0.31558	664	0.28949
583	0.19602	624	0.31663	665	0.30214
584	0.20577	625	0.30129	666	0.28346
585	0.20548	626	0.32338	667	0.3099
586	0.20455	627	0.32179	668	0.29112
587	0.20097	628	0.31898	669	0.32091
588	0.1816	629	0.31557	670	0.38711

Tabelle 4.10: zweiter Teil der Rohdaten des Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrinfarbstoffes in Propylenglykol

3.14	1.907	1.4381	0.448	0.0037
3.57	2.364	1.4355	0.428	0.0035
4.05	2.695	1.4408	0.377	0.0033
4.60	2.949	1.4422	0.380	0.0036
5.23	3.286	1.4456	0.354	0.0034
5.93	3.817	1.4477	0.510	0.0037
6.74	4.178	1.4542	0.403	0.0036
7.65	4.802	1.4590	0.387	0.0036
8.69	5.395	1.4647	0.435	0.0039
9.87	6.017	1.4721	0.432	0.0044
11.21	6.746	1.4791	0.391	0.0044
12.73	7.475	1.4895	0.413	0.0042
14.46	8.213	1.5055	0.436	0.0047
16.42	9.236	1.5230	0.459	0.0048
18.65	9.968	1.5447	0.519	0.0060
21.18	10.858	1.5687	0.584	0.0065
24.05	11.827	1.6025	0.652	0.0089
27.31	12.408	1.6362	0.815	0.0113
31.02	13.202	1.6743	0.790	0.0194

Tabelle 4.11: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes reinen SDS Mizellen

3.14	1.903	1.4314	0.456	0.0029
3.57	2.542	1.4281	0.367	0.0033
4.05	2.892	1.4322	0.387	0.0030
4.60	3.190	1.4342	0.360	0.0030
5.23	3.570	1.4364	0.379	0.0033
5.93	3.988	1.4402	0.374	0.0031
6.74	4.512	1.4437	0.394	0.0032
7.65	5.116	1.4493	0.411	0.0033
8.69	5.684	1.4552	0.404	0.0036
9.87	6.475	1.4624	0.371	0.0038
11.21	7.231	1.4671	0.436	0.0036
12.73	8.003	1.4811	0.533	0.0043
14.46	8.897	1.4961	0.451	0.0043
16.42	9.868	1.5150	0.486	0.0046
18.65	10.923	1.5352	0.496	0.0049
21.18	11.971	1.5595	0.495	0.0060
24.05	12.808	1.5928	0.643	0.0073
27.31	13.646	1.6300	0.753	0.0083
31.02	14.484	1.6711	0.790	0.0115

Tabelle 4.12: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 9:1

3.14	2.275	1.4708	0.601	0.0051
3.57	2.482	1.4719	0.557	0.0051
4.05	2.895	1.4766	0.553	0.0059
4.60	3.231	1.4797	0.592	0.0066
5.23	3.673	1.4821	0.551	0.0065
5.93	4.177	1.4866	0.606	0.0064
6.74	4.619	1.4909	0.581	0.0062
7.65	5.213	1.4951	0.611	0.0063
8.69	5.810	1.5044	0.671	0.0062
9.87	6.630	1.5138	0.682	0.0071
11.21	7.402	1.5181	0.739	0.0073
12.73	8.182	1.5340	0.716	0.0079
14.46	8.966	1.5500	0.717	0.0075
16.42	9.944	1.5714	0.720	0.0084
18.65	10.831	1.5982	0.800	0.0080
21.18	11.965	1.6201	0.767	0.0104
24.05	12.542	1.6550	0.933	0.0161
27.31	13.409	1.6874	1.283	0.0222
31.02	14.114	1.7162	1.137	0.0302

Tabelle 4.13: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 8:2

3.14	2.303	1.5161	0.588	0.0062
3.57	2.702	1.5177	0.534	0.0076
4.05	3.026	1.5187	0.560	0.0067
4.60	3.419	1.5225	0.574	0.0070
5.23	3.790	1.5260	0.549	0.0077
5.93	4.299	1.5295	0.581	0.0081
6.74	4.806	1.5348	0.574	0.0073
7.65	5.375	1.5404	0.614	0.0078
8.69	6.089	1.5536	0.605	0.0067
9.87	6.772	1.5630	0.707	0.0071
11.21	7.503	1.5743	0.656	0.0071
12.73	8.339	1.5875	0.692	0.0087
14.46	9.180	1.6073	0.745	0.0093
16.42	9.958	1.6314	0.790	0.0091
18.65	10.869	1.6539	0.765	0.0114
21.18	11.686	1.6819	0.903	0.0122
24.05	12.676	1.7144	0.977	0.0211
27.31	13.405	1.7341	1.100	0.0308
31.02	13.841	1.7673	1.207	0.0384

Tabelle 4.14: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 7:3

3.14	2.469	1.5557	0.366	0.0034
3.57	2.560	1.5587	0.370	0.0033
4.05	3.075	1.5586	0.378	0.0037
4.60	3.419	1.5633	0.371	0.0033
5.23	3.817	1.5697	0.376	0.0034
5.93	4.263	1.5726	0.400	0.0033
6.74	4.873	1.5798	0.408	0.0036
7.65	5.342	1.5876	0.425	0.0038
8.69	6.023	1.5955	0.424	0.0037
9.87	6.637	1.6060	0.452	0.0044
11.21	7.437	1.6161	0.451	0.0045
12.73	8.227	1.6335	0.457	0.0050
14.46	9.049	1.6529	0.474	0.0053
16.42	9.829	1.6755	0.510	0.0053
18.65	10.662	1.7043	0.518	0.0062
21.18	11.359	1.7328	0.527	0.0064
24.05	11.977	1.7711	0.646	0.0083
27.31	12.659	1.8114	0.748	0.0116
31.02	13.235	1.8485	0.755	0.0209

Tabelle 4.15: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 6:4

3.14	2.286	1.5806	0.398	0.0033
3.57	2.662	1.5808	0.341	0.0034
4.05	2.964	1.5844	0.326	0.0034
4.60	3.450	1.5873	0.358	0.0032
5.23	3.855	1.5909	0.420	0.0035
5.93	4.342	1.5949	0.331	0.0032
6.74	4.940	1.6022	0.358	0.0036
7.65	5.601	1.6100	0.417	0.0037
8.69	6.053	1.6194	0.400	0.0039
9.87	6.843	1.6307	0.416	0.0041
11.21	7.452	1.6438	0.456	0.0044
12.73	8.211	1.6597	0.455	0.0048
14.46	9.016	1.6818	0.417	0.0049
16.42	9.793	1.7067	0.520	0.0054
18.65	10.647	1.7350	0.498	0.0063
21.18	11.119	1.7640	0.597	0.0068
24.05	11.631	1.8052	0.628	0.0094
27.31	12.067	1.8466	0.726	0.0114
31.02	12.573	1.8877	0.798	0.0144

Tabelle 4.16: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 5:5

3.14	2.359	1.5957	0.390	0.0033
3.57	2.650	1.5990	0.350	0.0031
4.05	2.980	1.6014	0.337	0.0033
4.60	3.402	1.6051	0.314	0.0033
5.23	3.814	1.6092	0.342	0.0033
5.93	4.263	1.6139	0.354	0.0030
6.74	4.763	1.6210	0.311	0.0038
7.65	5.324	1.6280	0.440	0.0037
8.69	5.900	1.6386	0.419	0.0040
9.87	6.531	1.6502	0.399	0.0041
11.21	7.295	1.6624	0.428	0.0042
12.73	7.826	1.6801	0.768	0.0049
14.46	8.553	1.7015	0.452	0.0050
16.42	9.396	1.7264	0.531	0.0052
18.65	9.964	1.7545	0.526	0.0059
21.18	10.621	1.7837	0.582	0.0075
24.05	10.999	1.8221	0.632	0.0088
27.31	11.451	1.8634	0.869	0.0111
31.02	11.729	1.8984	0.795	0.0168

Tabelle 4.17: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 4:6

3.14	2.357	1.5643	0.415	0.0041
3.57	2.397	1.5697	0.378	0.0036
4.05	2.723	1.5723	0.383	0.0034
4.60	3.102	1.5769	0.456	0.0033
5.23	3.524	1.5808	0.367	0.0034
5.93	3.994	1.5843	0.384	0.0034
6.74	4.394	1.5924	0.386	0.0036
7.65	4.860	1.5993	0.489	0.0043
8.69	5.342	1.6082	0.415	0.0042
9.87	5.985	1.6192	0.380	0.0046
11.21	6.574	1.6292	0.438	0.0045
12.73	7.203	1.6460	0.450	0.0049
14.46	7.856	1.6656	0.578	0.0055
16.42	8.411	1.6877	0.501	0.0059
18.65	8.922	1.7118	0.569	0.0066
21.18	9.413	1.7370	0.643	0.0072
24.05	9.772	1.7691	0.905	0.0095
27.31	10.190	1.8038	0.728	0.0152
31.02	10.513	1.8224	0.915	0.0290

Tabelle 4.18: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 3:7

3.14	1.922	1.5007	0.422	0.0035
3.57	2.196	1.5049	0.334	0.0032
4.05	2.468	1.5064	0.339	0.0032
4.60	2.695	1.5066	0.358	0.0033
5.23	3.080	1.5119	0.361	0.0031
5.93	3.485	1.5165	0.349	0.0034
6.74	3.871	1.5235	0.343	0.0034
7.65	4.314	1.5297	0.396	0.0035
8.69	4.820	1.5379	0.381	0.0042
9.87	5.341	1.5465	0.402	0.0040
11.21	5.948	1.5529	0.388	0.0040
12.73	6.395	1.5721	0.409	0.0050
14.46	6.868	1.5883	0.481	0.0054
16.42	7.391	1.6060	0.527	0.0055
18.65	7.875	1.6280	0.558	0.0054
21.18	8.322	1.6489	0.519	0.0072
24.05	8.755	1.6783	0.715	0.0090
27.31	8.855	1.7063	0.715	0.0102
31.02	9.111	1.7313	0.943	0.0181

Tabelle 4.19: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 2:8

3.14	2.449	1.6249	0.396	0.0037
3.57	2.749	1.6248	0.345	0.0036
4.05	3.196	1.6289	0.354	0.0034
4.60	3.495	1.6340	0.374	0.0033
5.23	3.902	1.6395	0.349	0.0030
5.93	4.319	1.6459	0.330	0.0033
6.74	4.919	1.6523	0.355	0.0036
7.65	5.464	1.6607	0.380	0.0038
8.69	6.059	1.6732	0.401	0.0041
9.87	6.740	1.6845	0.406	0.0041
11.21	7.299	1.6997	0.383	0.0049
12.73	8.023	1.7165	0.425	0.0050
14.46	8.616	1.7432	0.491	0.0051
16.42	9.317	1.7689	0.440	0.0057
18.65	9.792	1.7993	0.528	0.0066
21.18	10.520	1.8315	0.577	0.0075
24.05	10.784	1.8697	0.651	0.0100
27.31	11.167	1.9110	0.663	0.0134
31.02	11.310	1.9388	0.864	0.0267

Tabelle 4.20: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 1:9

3.14	2.437	1.3888	0.389	0.0033
3.57	2.548	1.3919	0.354	0.0030
4.05	3.040	1.3941	0.340	0.0028
4.60	3.338	1.3961	0.330	0.0030
5.23	3.830	1.3994	0.360	0.0030
5.93	4.367	1.4032	0.333	0.0033
6.74	4.863	1.4078	0.365	0.0032
7.65	5.521	1.4132	0.349	0.0030
8.69	6.161	1.4210	0.396	0.0034
9.87	6.936	1.4291	0.398	0.0036
11.21	7.796	1.4363	0.407	0.0042
12.73	8.664	1.4522	0.462	0.0040
14.46	9.564	1.4677	0.467	0.0048
16.42	10.546	1.4887	0.458	0.0051
18.65	11.639	1.5172	0.530	0.0064
21.18	12.569	1.5427	0.576	0.0062
24.05	13.559	1.5779	0.726	0.0082
27.31	14.146	1.6196	0.785	0.0113
31.02	15.032	1.6572	0.900	0.0218

Tabelle 4.21: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in C₁₂TAB-Mizellen

3.14	2.499	1.3884	0.417	0.0031
3.57	2.689	1.3903	0.375	0.0030
4.05	3.063	1.3923	0.341	0.0031
4.60	3.483	1.3928	0.356	0.0033
5.23	3.915	1.3965	0.352	0.0031
5.93	4.391	1.4002	0.354	0.0033
6.74	4.956	1.4033	0.382	0.0030
7.65	5.571	1.4084	0.388	0.0033
8.69	6.316	1.4158	0.402	0.0038
9.87	7.119	1.4231	0.422	0.0038
11.21	7.941	1.4322	0.487	0.0043
12.73	8.851	1.4466	0.456	0.0045
14.46	9.778	1.4626	0.477	0.0055
16.42	10.771	1.4819	0.480	0.0056
18.65	11.752	1.5064	0.564	0.0061
21.18	12.732	1.5306	0.581	0.0065
24.05	13.653	1.5696	0.708	0.0105
27.31	14.611	1.6050	0.817	0.0188
31.02	15.422	1.6286	0.965	0.0319

Tabelle 4.22: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in C₁₂TAB / 1-Hexanol-Mizellen

3.14	2.217	1.2782	0.505	0.0037
3.57	2.477	1.2887	0.430	0.0041
4.05	2.824	1.2899	0.397	0.0034
4.60	3.159	1.2931	0.378	0.0038
5.23	3.661	1.2922	0.575	0.0037
5.93	4.022	1.2972	0.427	0.0038
6.74	4.670	1.3003	0.486	0.0041
7.65	5.259	1.3037	0.425	0.0042
8.69	5.862	1.3069	0.533	0.0043
9.87	6.574	1.3119	0.445	0.0047
11.21	7.523	1.3178	0.483	0.0050
12.73	8.426	1.3286	0.572	0.0053
14.46	9.432	1.3384	0.664	0.0060
16.42	10.467	1.3532	0.587	0.0075
18.65	11.760	1.3688	0.627	0.0073
21.18	13.029	1.3845	0.749	0.0116
24.05	14.067	1.3982	1.009	0.0279
27.31	15.567	1.4060	1.802	0.0337

Tabelle 4.23: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Natriumoctylsulfat-Mizellen

3.14	2.291	1.3253	0.417	0.0029
3.57	2.476	1.3293	0.355	0.0027
4.05	2.834	1.3305	0.379	0.0027
4.60	3.216	1.3332	0.348	0.0029
5.23	3.660	1.3349	0.329	0.0029
5.93	4.098	1.3381	0.387	0.0029
6.74	4.579	1.3416	0.351	0.0031
7.65	5.184	1.3459	0.361	0.0030
8.69	5.825	1.3496	0.383	0.0032
9.87	6.570	1.3576	0.396	0.0038
11.21	7.424	1.3630	0.391	0.0037
12.73	8.256	1.3775	0.414	0.0039
14.46	9.197	1.3917	0.530	0.0046
16.42	10.222	1.4086	0.493	0.0050
18.65	11.273	1.4282	0.469	0.0052
21.18	12.349	1.4511	0.547	0.0059
24.05	13.335	1.4831	0.714	0.0079
27.31	14.347	1.5184	0.767	0.0109
31.02	15.268	1.5526	0.928	0.0179

Tabelle 4.24: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Natriumdecylsulfat-Mizellen

3.14	2.181	1.4218	0.400	0.0028
3.57	2.494	1.4210	0.332	0.0028
4.05	2.760	1.4263	0.315	0.0028
4.60	3.086	1.4247	0.329	0.0031
5.23	3.501	1.4316	0.338	0.0029
5.93	3.965	1.4346	0.331	0.0030
6.74	4.514	1.4385	0.336	0.0030
7.65	5.078	1.4430	0.341	0.0032
8.69	5.684	1.4490	0.348	0.0037
9.87	6.365	1.4569	0.408	0.0037
11.21	7.089	1.4630	0.404	0.0037
12.73	7.878	1.4768	0.395	0.0041
14.46	8.883	1.4927	0.464	0.0042
16.42	9.744	1.5103	0.457	0.0047
18.65	10.759	1.5333	0.524	0.0053
21.18	11.704	1.5578	0.519	0.0061
24.05	12.412	1.5910	0.578	0.0077
27.31	13.378	1.6286	0.710	0.0088
31.02	14.149	1.6698	0.812	0.0109

Tabelle 4.25: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Natriumdodecylsulfat-Mizellen

3.14	0.563	1.0836	0.382	0.0028
3.57	0.521	1.0858	0.376	0.0026
4.05	0.671	1.0854	0.404	0.0025
4.60	0.723	1.0866	0.355	0.0024
5.23	0.840	1.0858	0.336	0.0024
5.93	0.894	1.0867	0.361	0.0025
6.74	1.041	1.0868	0.392	0.0026
7.65	1.221	1.0874	0.360	0.0027
8.69	1.391	1.0871	0.388	0.0029
9.87	1.593	1.0877	0.402	0.0031
11.21	1.724	1.0865	0.408	0.0031
12.73	2.016	1.0870	0.454	0.0035
14.46	2.270	1.0884	0.471	0.0036
16.42	2.667	1.0888	0.502	0.0037
18.65	2.939	1.0901	0.568	0.0044
21.18	3.341	1.0896	0.576	0.0042
24.05	3.805	1.0915	0.777	0.0052
27.31	4.331	1.0939	0.886	0.0071
31.02	5.045	1.0964	0.968	0.0086

Tabelle 4.26: Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Tetrahydrofuran

Abbildungsverzeichnis

1.1	Beispiele für ionische und nichtionische Tenside	4
1.2	Beispiele von möglichen Mizellgestalten	5
1.3	Mizelle eines ionischen Tensids	6
1.4	wichtige Manifestationen der Mizellbildung	7
1.5	Fluorophore, die zur Strukturaufklärung von Mizellen geeignet sind	10
1.6	Ein Jablonski-Diagramm	14
1.7	Bestimmung des zufälligen Phasenwinkels	16
1.8	Bestimmung der Modulation und der Phase	17
1.9	Emissionsintensität eines Fluorophormoleküls in einem Koordinatensystem	21
1.10	Messung der Anisotropieabklingzeiten	24
1.11	Abbildung von Ellipsoiden	28
1.12	Absorptions- und Emissionsdipolmoment eines Fluorophors innerhalb eines prolaten Ellipsoids	29
1.13	Rotationskorrelationszeiten eines prolaten Ellipsoids	31
1.14	Ausrichtung des Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoments eines Fluorophors entlang einer Halbachse eines prolaten Rotationsellipsoids . . .	31
2.1	schematische Skizze der Meßapparatur	34
2.2	schematische Skizze des fluorimetrischen Teils der Messapparatur	35
2.3	Bestimmung des G-Faktors nach der Einkanalmethode	40
2.4	Skizze der Temperaturmessvorrichtung	43
2.5	Skizze des Titrationskalorimeters	44
3.1	Sulfonieren von 2-Methylpyridin	49
3.2	Methylierung von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure	50
3.3	Synthese von N-Cyclohexylethanimin	51

3.4	Synthese von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal	52
3.5	Kondensation von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat	53
3.6	Abbildung von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien	54
3.7	Reaktion von Zimtaldehyd mit Malonsäure in Gegenwart von Pyridin . . .	55
3.8	Reaktion von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal mit Malonsäurediethylester in Gegenwart von Piperidin und Benzoessäure	56
3.9	Abbildung von 4-(Pyrenyl-1)-1,1'-(diethoxycarbonyl)-buta-1,3-dien	57
3.10	Reaktion von Dipropylenglykolmonomethylether mit Phosphortribromid . .	58
3.11	Umsetzung von Dowanolbromid mit 4-Hydroxybenzaldehyd	59
3.12	Umsetzung von Dowanolbenzaldehyd mit Pyrrol	60
3.13	Abbildung des NMR-Spektrums des Tetraphenylporphyrinderivates	62
4.1	Absorptions- und Emissionsspektren von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal	65
4.2	Lippert-Plot von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal	66
4.3	Absorptions- und Emissionsspektren von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien	68
4.4	Lippert-Plot von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien	69
4.5	Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektrum des Porphyrinfarbstoffs in 0.22 mol/l SDS-Lösung	70
4.6	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.43 molarer Natriumoctylsulfatlösung	72
4.7	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.38 molarer Natriumdecylsulfatlösung	72
4.8	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.22 molarer Natriumdodecylsulfatlösung	73
4.9	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer Natriumdodecylsulfatlösung	73
4.10	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.22 molarer C ₁₂ TAB-Lösung	74
4.11	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 0.22 molarer C ₁₂ TAB-Lösung mit 0.11 molarem Hexanol	74
4.12	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 3:2	75

4.13	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 7:3	75
4.14	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 4:1	76
4.15	Time-domain Spektrum des Abklingverhaltens des Porphyrinderivats in 60 millimolarer SDS / TDMAO - Lösung im Volumenverhältnis 9:1	76
4.16	Aufnahme eines Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrinfluorophors in Propylenglykol bei -70°C	77

Tabellenverzeichnis

1.1	Erwartete Aggregatgeometrien als Funktion des kritischen Packungsparameters	8
1.2	Halbachsenlängen für Mizellen aus wäßrigen C ₁₂ TAB- und 1-Hexanollösungen	9
1.3	Halbachsenlängen für Mizellen aus wäßrigen SDS- und TDMAO-Lösungen .	9
2.1	Kalibrierung der Spritzen	45
3.1	NMR-Daten von 2-Methylpyridin-5-sulfonsäure in D ₂ O	50
3.2	NMR-Daten von 1,2-Dimethylpyridin-1-ium-5-sulfonat in D ₂ O	51
3.3	NMR-Daten von N-Cyclohexylethanimin in Benzol-d ₆	51
3.4	NMR-Daten von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in CDCl ₃	53
3.5	NMR-Daten von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien	54
3.6	NMR-Daten von 5-Phenylpenta-2,4-diensäure in CDCl ₃	55
3.7	NMR-Daten von 4-(Pyrenyl-1)-1,1'-(diethoxycarbonyl)-buta-1,3-dien	57
3.8	NMR-Daten von Dowanolbromid in CDCl ₃	58
3.9	NMR-Daten von Dowanolbenzaldehyd in CDCl ₃	59
3.10	NMR-Daten des Tetraphenylporphyrinderivats in CDCl ₃	61
3.11	Verwendete Chemikalien	63
4.1	Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima von 3-(Pyrenyl-1)-prop-2-enal in verschiedenen Lösungsmitteln	66
4.2	Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima von 1-(1-Methylpyridin-1-ium-3-sulfonat-6)-4-(pyrenyl-1)-buta-1,3-dien in verschiedenen Lösungsmitteln	68
4.3	Abklingzeiten des Porphyrinderivats in verschiedenen Tensidsystemen . . .	71
4.4	Auswertung der Anisotropiemeßdaten für das System C ₁₂ TAB / 1-Hexanol	79

4.5	Modellierung der Mizellen des Systems C ₁₂ TAB / 1-Hexanol	79
4.6	Auswertung der Anisotropiemeßdaten für Natriumoctylsulfat, -decylsulfat und -dodecylsulfat	79
4.7	Auswertung der Anisotropiemeßdaten für das System SDS / Tetradecyldi- methylaminoxid	83
4.8	Modellierung der Mizellen für das System SDS / Tetradecyldimethylaminoxid	83
4.9	erster Teil der Rohdaten des Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrin- infarbstoffes in Propylenglykol	86
4.10	zweiter Teil der Rohdaten des Excitationsanisotropiespektrums des Porphyrin- infarbstoffes in Propylenglykol	87
4.11	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes reinen SDS Mizellen	88
4.12	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 9:1	88
4.13	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 8:2	89
4.14	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 7:3	89
4.15	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 6:4	90
4.16	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 5:5	90
4.17	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 4:6	91
4.18	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 3:7	91
4.19	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 2:8	92
4.20	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in SDS / TDMAO Mizellen im Verhältnis 1:9	92
4.21	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in C ₁₂ TAB-Mizellen	93
4.22	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in C ₁₂ TAB / 1-Hexanol-Mizellen	93
4.23	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Natriumoctylsulfat-Mizellen	94
4.24	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Natriumdecylsulfat-Mizellen	94
4.25	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Natriumdodecylsulfat-Mizellen	95
4.26	Anisotropiemeßdaten des Porphyrinfarbstoffes in Tetrahydrofuran	95

Literaturverzeichnis

- [1] N. C. Maiti, S. Mazumdar, N. Periasamy, „Dynamics of Porphyrin Molecules in Micelles. Picosecond Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Studies“ *J. Phys. Chem.* **99**, 10708-10715 (1995)
- [2] N. C. Maiti, M. M. G. Krishna, P. J. Britto, N. Periasamy, „Fluorescence Dynamics of Dye Probes in Micelles“ *J. Phys. Chem. B* **101**, 11051-11060 (1997)
- [3] S. Matzinger, D. M. Hussey, M. D. Fayer, „Fluorescence Probe Solubilization in the Headgroup and Core Regions of Micelles: Fluorescence Lifetime and Oriental Relaxation Measurements“ *J. Phys. Chem. B* **102**, 7216-7224 (1998)
- [4] E. L. Quitevis, A. H. Marcus, M. D. Fayer, „Dynamics of Ionic Lipophilic Probes in Micelles: Picosecond Fluorescence Depolarisation Measurements“ *J. Phys. Chem.* **97**, 5762-5769 (1993)
- [5] A. J. W. G. Visser, K. Vos, A. van Hoek, J. S. Santema, „Time Resolved Fluorescence Depolarization of Rhodamine B and Octadecylrhodamine B in Triton X-100 Micelles and Aerosol OT Reversed Micelles“ *J. Phys. Chem.* **92**, 759-765 (1988)
- [6] S. K. Pal, D. Sukul, D. Mandal, S. Sen, K. Bhattacharyya, „Solvation dynamics of DCM in micelles“ *Chem. Phys. Letters* **327**, 91-96 (2000)
- [7] G. B. Behera, B. K. Mishra, P. K. Behera, M. Panda, „Fluorescent Probes for structural and distance effect studies in micelles, reversed micelles and microemulsions“ *Adv. Coll. Interf. Sci.* **82**, 1-42 (1999)
- [8] G. D. Correll, R. N. Cheser, F. Nome, J. H. Fendler, „Fluorescent Probes in Reversed Micelles. Luminescence Intensities, Lifetimes, Quenching, Energy Transfer, and Depolarization of Pyrene Derivatives in Cyclohexane in the Presence of Dodecylammonium Propionate Aggregates“ *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 1254-1262 (1978)
- [9] R. Wang, F. V. Bright, „Rotational Reorientation Kinetics of Dansylated Bovine Serum Albumin“, *J. Phys. Chem.* **97**, 4231-4238 (1993)
- [10] J. Sipior, G. M. Carter, J. R. Lakowicz, G. Rao, „Single quantum well light emitting diodes demonstrated as excitation sources for nanosecond phase-modulation fluorescence lifetime measurements, *Rev. Sci. Instrum.* **67**(11), 3795-3798 (1996)
- [11] B. Barbieri, F. DePiccoli, E. Gratton, „Synthesizers' phase noise in frequency-domain fluorometry“, *Rev. Sci. Instrum.* **60**(10), 3201-3206 (1989)

- [12] J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, "Construction and Performance of a Variable-Frequency Phase-Modulation Fluorometer" *Biophys. Chem.* **21**, 61-78 (1985)
- [13] J. R. Lakowicz, G. Laczko, I. Gryczynski, H. Szmecinski, W. Wicz, "Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopy; Principles, Biochemical Applications and Future Developments" *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **93**, 316-327 (1989)
- [14] R. B. Thompson, J. K. Frisoli, J. R. Lakowicz, "Phase Fluorometry Using a Continuously Modulated Laser Diode" *Anal. Chem.* **64**, 2075-2078 (1992)
- [15] H. N. Fonda, J. V. Gilbert, R. A. Cormier, J. R. Sprague, K. Kamioka, J. S. Conolly, "Spectroscopic, Photophysical, and Redox Properties of Some Meso-Substituted Free-Base Porphyrins" *J. Phys. Chem.* **97**, 7024-7033 (1993)
- [16] M. Gouterman, L. Stryer, "Fluorescence Polarization of Some Porphyrins" *J. Chem. Phys.* **37**, 2260-2266 (1962)
- [17] U. Pfüller, "Mizellen-Vesikel-Mikroemulsionen. Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie" **22**, Springer-Verlag, Berlin (1986)
- [18] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, "Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **72**, 1525-1568 (1976)
- [19] D. J. Mitchell, B. W. Ninham, "Micelles, Vesicles and Microemulsions", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **77**, 601-629 (1981)
- [20] H. Pilsl, H. Hoffmann, S. Hofmann, J. Kalus, A. W. Kencono, P. Lindner, W. Ulbricht, "Shape Investigation of Mixed Micelles by Small Angle Neutron Scattering" *J. Phys. Chem.* **97**, 2745-2754 (1993)
- [21] J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow (1999)
- [22] R. P. Bonar-Law, "Porphyrin Synthesis in Surfactant Solution: Multicomponent Assembly in Micelles" *J. Org. Chem.* **61**, 3623-3634 (1996)
- [23] S.-H. Chou, M. J. Wirth, "Rotational Diffusion of Acridin Orange Attached to SDS Micelles" *J. Phys. Chem.* **93**, 7694-7698 (1989)
- [24] P. Lianos, J. Lang, C. Strazielle, R. Zana, "Fluorescence Probe Study of Oil-in-Water Microemulsions. 1. Effect of Pentanol and Dodecane or Toluene on Some Properties of Sodium Dodecylsulfate Micelles" *J. Phys. Chem.* **86**, 1019-1025 (1982)
- [25] N. Wittouck, R. M. Negri, M. Ameloot, F. C. De Schryver, "AOT Reversed Micelles Investigated by Fluorescence Anisotropy of Cresyl Violet" *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10601-10611 (1994)
- [26] M. E. Mc Carroll, A. G. Joly, Z. Wang, D. M. Friedrich, R. von Wandruszka, "Time-Resolved Fluorescence Anisotropies in Mixed Surfactant Solutions" *J. Colloid Interf.* **218**, 260-264 (1999)

- [27] J. R. Lakowicz, H. Cherek, J. Kusba, I. Gryczynski, M. L. Johnson, „Review of Fluorescence Anisotropy Decay Analysis by Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopy“ *J. Fluorescence* **3**, 103-116 (1993)
- [28] J. Bach, M. J. Blandamer, J. Burgess, P. M. Cullis, P. Tran, L. G. Soldi, K. C. Rao, M. C. S. Subha, A. Kacperska, „Enthalpies of micelle formation by hexadecyltrimethylammonium bromide in aqueous solution containing pentanol“ *J. Phys. Org. Chem.* **8**, 108-112 (1995)
- [29] M. J. Blandamer, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, „Calorimetric studies of macromolecular aqueous solutions“ *Pure Appl. Chem.* **68**, 1577-1582 (1996)
- [30] J. Bach, M. J. Blandamer, K. Bijma, J. B. F. N. Engberts, P. A. Kooreman, A. Kacperska, K. C. Rao, M. C. S. Subha, „Titration Calorimetric and Spectrophotometric Studies of Micelle Formation by Alkyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Solution“ *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **91**, 1229-1235 (1995)
- [31] K. Bijma, J. B. F. N. Engberts, M. J. Blandamer, P. M. Cullis, P. M. Last, K. D. Irlam, L. G. Soldi, „Classification of calorimetric titration plots for alkyltrimethylammonium and alkylpyridinium cationic surfactants in aqueous solutions“ *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **93**, 1579-1584 (1997)
- [32] M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Cullis, K. D. Irlam, J. B. F. N. Engberts, J. Kevelam, „Titration microcalorimetry of adsorption processes in aqueous systems“ *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **94**, 259-266 (1998)
- [33] R. Wachter, „Chapter 9: Instrumentation in Titration Calorimetry“, in: „Thermometric Titrations“ **45**, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1975)
- [34] K. N. Marsh, P. A. G. O'Hare, „Solution Calorimetry: Experimental Thermodynamics, Volume IV“, Abschnitt 3.4: „The Isoperibol Solution Calorimeter“, Blackwell Scientific Publications, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Vienna (1994)
- [35] S. M. McElvain, M. A. Goese, „The Sulfonation of Pyridine and the Picolines“ *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 2233-2236 (1943)
- [36] J. J. Lalonde, D. E. Bergbreiter, M. Newcomb, „Dynamic Structures of Zinc, Magnesium, and Aluminium Azaallylmetal Reagents“ *J. Org. Chem.* **51**, 1369-1372 (1986)
- [37] A. Lüttringhaus, „Cyclisationen von langkettigen Dithiolen“ *Ann. Chem.* **613**, 185-198 (1958)
- [38] A. Meziani, A. Zradba, D. Touraud, M. Clausse, W. Kunz, „Can aldehydes participate in the nanostructuration of liquids containing charged micelles?“ *J. Mol. Liquids* **73**, **74**, 107-118 (1997)
- [39] C. Tanford, „The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes“ John Wiley and Sons: New York, 75 (1980)

- [40] G.D'Errico, O.Ortona, L.Paduano, V.Vitagliano, „Transport Properties of Aqueous Solutions of Alkyltrimethylammonium Bromide Surfactants at 25°C“ *J. Colloid Interf. Sci* **239**, 264-271 (2001)
- [41] I. Johnson, G. Olofsson, M. Landgren and B. Jönsson, „Solubilisation of Pentanol in Sodium Dodecylsulfate Micelles“, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **85**(12), 4211-4225 (1989)
- [42] J. Barthel, „Chapter 2: Theoretical basis for an analysis of thermograms“, in: „Thermometric Titrations“ **45**, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1975)
- [43] A. Chatterjee, S. P. Moulik, S. K. Sanyal, B. K. Mishra, P. M. Puri, „Thermodynamics of Micelle Formation of Ionic Surfactants: A Critical Assessment for Sodium Dodecyl Sulfate, Cetyl Pyridinium Chloride and Dioctyl Sulfosuccinate (Na Salt) by Microcalorimetric, Conductometric, and Tensiometric Measurements“ *J. Phys. Chem. B* **105**, 12823-12831 (2001)
- [44] R. Chaudhuri, J. Guharay, P.K. Sengupta, „Fluorescence polarization anisotropy as a novel tool for the determination of critical micellar concentrations“ *J. Photochem. Photobiol. A* **101**, 241-244 (1996)
- [45] R. Zana, „Aqueous Surfactant-Alcohol Systems: A Review“ *Adv. Colloid Interface Sci.* **57**, 1-64 (1995)
- [46] J. N. Israelachvili, „Intermolecular and Surface Forces“, Academic Press, London, 250 (1992)
- [47] F. Bockstahl, G. Duplâtre, „Quantitative determination of a sodium dodecyl sulfate micellar radius through positron annihilation lifetime spectroscopy“ *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 2767-2772 (1999)
- [48] M. Bergström, J. S. Pedersen, „Structure of pure SDS and DTAB micelles in brine determined by small-angle neutron scattering (SANS)“ *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 4437-4446 (1999)
- [49] S. Vass, „Four-Component Micellar Model for Small-Angle Scattering Applications: A SANS Study of the Core and Counterion Profiles of Sodium Alkyl Sulfate Micelles“ *J. Phys. Chem. B* **105**, 455-461 (2001)
- [50] S. Vass, T. Gilányi, S. Borbély, „SANS Study of the Structure of Sodium Alkyl Sulfate Micellar Solutions in Terms of the One-Component Macrofluid Model“ *J. Phys. Chem. B* **104**, 2073-2081 (2000)
- [51] P. J. Missel, N. A. Mazer, G. B. Benedek, M. C. Carey, „Influence of Chain Length on the Sphere-to-Rod Transition in Alkyl Sulfate Micelles“, *J. Phys. Chem.* **87**, 1264-1277 (1983)
- [52] S. Berr, R. R. M. Jones, J. S. Johnson Jr., „Effect of Counterion on the Size and Charge of Alkyltrimethylammonium Halide Micelles as a Function of Chain Length and Concentration As Determined by Small-Angle Neutron Scattering“ *J. Phys. Chem.* **96**, 5611-5614 (1992)